



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO

KALLE TUOMI
FLUORESENSSELINAIKAMIKROSKOOPILLE SOVELTUVAT
pH-HERKÄT MERKKIAINEET
Kandidaatintyö

Kemian ja biotekniikan laitos

Tarkastaja: Yliopistonlehtori Elina
Vuorimaa-Laukkanen

TIIVISTELMÄ

TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO

Teknis- Luonnontieteellinen koulutusohjelma

TUOMI, KALLE: Fluoresensselinaikamikroskoopille soveltuvat pH-herkät merkkiaineet (pH-sensitive fluorescent dyes for fluorescent lifetime imaging microscopy)

Kandidaatintyö, 26 sivua

Lokakuu 2018

Pääaine: Kemia

Tarkastaja: Yliopistonlehtori Elina Vuorimaa-Laukkanen

Avainsanat: FLIM, fluoresenssin elinaika, fluoresoiva merkkiaine, fluorofori, pH, GFP

Tässä työssä selvitetään Tampereen teknisen yliopiston kemian ja biotekniikan laitoksen tutkimusryhmälle fluoresenssin elinaika mikroskopiaan (FLIM) soveltuvia merkkiaineita. Vaatimuksina merkkiaineille on pH-herkkyys erityisesti solunsisäisellä pH alueella. FLIM -laitteiston osalta lisä vaatimuksina työlle tulevat mahdolliset fluoresoivan merkkiaineen viritusaallonpituudet: 375 nm, 405 nm, 483 nm ja 658 nm. Työn tavoitteena on siis löytää aiemmin sovellettuja merkkiaineita, jotka toimivat edellä mainituilla parametreilla. Fluoresoivia merkkiaineita on useita ja niitä käytetään monien eri parametrien määrittämiseen eri tarkoituksissa. Suurin osa käytetyistä fluoresoivista merkkiaineista soveltuu kuitenkin vain intensiteetin mittaamiseen perustuviin menetelmiin, mikä rajaa kyseiset merkkiaineet pois työn tavoitteesta. pH-herkkien FLIM soveltuvien merkkiaineiden etsiminen suuresta artikkeli määrästä on hidasta. Löytyvien merkkiaineiden määrää rajaa myös käytettävät aallonpituudet.

Tässä työssä käydään läpi fluoresenssin teoriaa, fluoresoivien merkkiaineiden ja niiden rakennetta sekä toimintaa. Työssä selvitetään myös tarkemmin pH-herkkien merkkiaineiden ominaisuuksia ja käydään läpi aiempia sovelluksia. Teoriaosassa perehdytään aluksi fluoresenssin prosessiin, fluoresenssin elinaikaan ja miten ympäristö vaikuttaa fluoresenssiin. Fluoresoivissa merkkiaineissa käydään ensin läpi yleisesti merkkiaineiden ominaisuuksia ja syvennyttään sitten työn kannalta olennaisten merkkiaineiden rakenteisiin. Lopuksi käydään läpi autofluoresenssia, pH-herkkiä merkkiaineita ja artikkeleita, joissa on sovellettu kyseisiä merkkiaineita. Kirjallisen tutkimuksen perusteella tutkimusryhmälle parhaiten soveltuisivat C-SNARF-4, BCECF-AM, EYFP ja EGFP merkkiaineet. Kyseiset merkkiaineet yhdessä kattavat solun sisäisen pH:n 4,5-8,2. Näiden lisäksi löytyi myös muita pH-alueelle soveltuvia merkkiaineita mutta merkkiaineita ei ole sovellettu solun sisäisesti.

SISÄLLYS

1.	Johdanto	1
2.	Fluoresenssi	2
2.1.	Fluoresenssin perusteet	2
2.2.	Fluoresenssin elinaika	8
2.3.	Ympäristön vaikutukset fluoresoivan merkkianeen fluoresenssiin	9
3.	Fluoresoivat merkkiaineet	13
3.1.	Fluoresoivat merkkiaineet yleisesti	13
3.2.	Fluoresoivien merkkiaineiden rakenne ja toiminta	15
4.	pH-herkät merkkiaineet	19
4.1.	Solujen autofluoresoivat molekyylit	19
4.2.	Solun sisäisiin pH-muutoksiin sopivia merkkiaineita	22
5.	Yhteenveto ja johtopäätökset	25
	Lähteet	27

TERMIT JA NIIDEN MÄÄRITELMÄT

FLIM	Fluorescence lifetime imaging eli fluoresenssi elinaika microscopy
kDa	Kilodaltoni on molekyyli­massan yksikkö. Sitä käytetään usein isojen molekyylien kuten proteiinien kohdalla.
GFP	Green Fluorescent Protein eli vihreä fluoresoiva proteiini. Vastaavasti käytetään myös RFP punaiselle, YFP keltaisella ja CFP syaanilla (cyan) absorboituneen valon värin mukaan.
EYFP	Enhanced yellow fluorescent protein eli vahvistettu keltainen fluoresoiva proteiini. Löytyy myös kuten GFP:stä myös vastaavat vihreälle ja syaanille.
FRET	Förster resonance energy transfer tai fluoresenssin resonanssi energian siirto
IC	Internal conversion eli sisäsiirtymä
ISC	Intersystem crossing eli systeemien välinen siirtymä
h	Planckin vakio
ν_f	Fluoresenssissa vapautuneen fotonin frekvenssi
ν_p	Fosforesenssissa vapautuneen fotonin frekvenssi
q	Systeemin lämpö

1. JOHDANTO

Nykyisin käytetään useita fluoresoivia merkkiaineita, jotka mahdollistavat elävien solujen kemiallisten ominaisuuksien tutkimisen. Fluoresenssiin perustuvat tutkimusmenetelmät käyttävät joko fluoresenssin intensiteetin tai fluoresenssin elinajan muutoksia tutkittavan parametrin mittana. Vaikka intensiteetti mittaukset ovat yksinkertaisia ja tarkkoja laboratoriossa, ovat ne usein puutteellisia luonnollisemmissa tilanteissa. Monet näytteen ympäristö parametrit vaikuttavat intensiteetti mittausten laatuun esimerkiksi fluoresoivan merkkiaineen tasainen jakautuminen näytteessä. Fluoresenssin elinaika mittaukset eivät ole niin suoraviivaiset kuin fluoresenssin intensiteettiin perustuvat mittaukset, mutta fluoresenssin elinaika mittauksen tarkkuus vaihtelevissa olosuhteissa on parempi.

Sopivia merkkiaineita käyttämällä fluoresenssin elinaikamikroskopiolla voidaan tutkia elävän solun ominaisuuksia tai esimerkiksi, minne solun sisällä tietyt molekyylit kulkeutuvat ja minkälaiseen ympäristöön molekyylit joutuvat. Lääkeaineiden kannalta on tärkeä tietää, kuljettaako solu molekyylit haluttuun paikkaan vai siirtääkö solu vierasmolekyylit suoraan ulos solusta tai lysosomeihin tuhottaviksi. Merkkiaineilla voidaan kartoittaa myös lääkeainemolekyylien kuljetusreitien ympäristöominaisuuksia, kuten ionipitoisuuksia, molekyylilienvälisiä vuorovaikutuksia, viskositeettiä tai pH:ta. Osa lääkeaineista on herkkiä ympäröivien olosuhteiden osalta. Mikäli lääkeaine reagoi ympäristöön ennen määränpäähän saapumista, voi lääkeaineen haluttu vaikutus mennä hukkaan.

Työn tarkoituksena on tutkia kirjallisuudesta Tampereen teknillisen yliopiston (TTY) tutkimusryhmän FLIM-laitteistolle sopivia merkkiaineita. Ongelmana on se, että kaikki merkkianeet eivät virity samoilla aallonpituuksilla, eivätkä kaikki laitteistot sovellu kaikille aallonpituuksille. FLIM -laitteiston rajoitusten takia fluoresoivien merkkiaineiden viritysaallonpituudet tulee olla: 375 nm, 405 nm, 483 nm tai 658 nm. Työn tavoitteena on löytää aiemmin sovellettuja merkkiaineita, jotka toimivat edellä mainituilla parametreilla.

Työssä selvitetään fluoresenssin ja fluoresoivien merkkiaineiden teoreettista taustaa ja on etsitty tutkimusryhmälle soveltuvia merkkiaineita. Toisessa luvussa selvitetään aluksi fluoresenssin ja fluoresenssin elinajan teoreettista taustaa. Kolmannessa luvussa käydään läpi millaisia merkkianeita muut tutkimus ryhmät ovat käyttäneet. Neljännessä luvussa käydään läpi tarkemmin pH-herkkien merkkiaineiden rakennetta, aiemmin sovellettuja merkkiaineita ja solun sisäisiin pH-vaihteluihin sopivia merkkiaineita sekä merkkiaineiden viritysaallonpituuksia. Viides luku kokoaa yhteen tutkielman havainnot ja mahdollisesti tutkimusryhmälle soveltuvat merkkianeet.

2. FLUORESENSSI

Absorboidessaan fotonin perustilassa oleva molekyyli virittyy ulkoisen valon tai muun sähkömagneettisen säteilyn vaikutuksesta korkeammalle energia tasolle. Molekyylin on purettava virittynyt energia palatakseen takaisin perustilaan. Yksi tapa purkaa viritystila on fluoresenssi, jolloin virittyneen ja perustilan välinen erotus vapautuu ympäristöön valona. Useimmiten lähtevän valon aallonpituus on pidempi kuin absorboidun valon. Lähtevän valon energia on siis pienempi kuin absorboidun valon energia. Selvin esimerkki fluoresoinnista ovat tapaukset, joissa absorptio tapahtuu ultraviolettin valon alueella ja emissio näkyvän valon aallonpituuksilla. Fluoresoiva kappale vaikuttaa vaihtavan väriään, kun sitä valaistaa UV-lampulla. Fluoresenssin värimuutos palautuu nopeasti, kun UV-valo poistetaan.

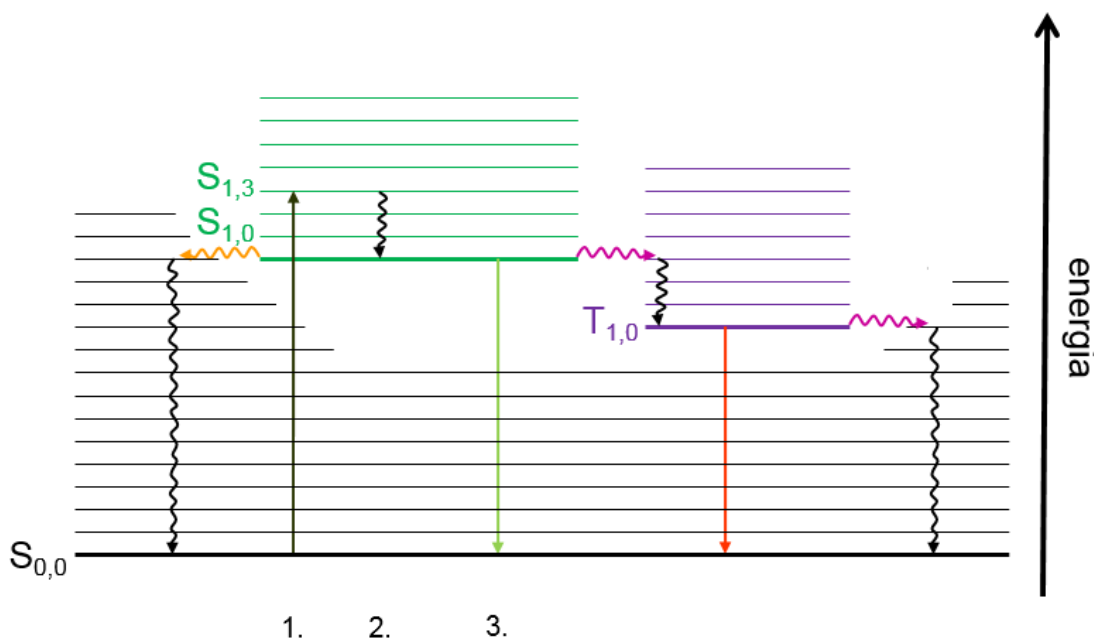
2.1. Fluoresenssin perusteet

Fluoresenssi on kolmivaiheisen prosessin (kuva 1) tulos, mikä ilmenee tietyissä molekyyleissä. Näitä molekyylejä kutsutaan fluoroforeiksi (fluorophore) tai fluoresoiviksi väriaineeksi (fluorescent dye). Fluoresoivia merkkiaineita käytetään ilmaisemaan tiettyä ympäristön ominaisuutta tai tiettyä paikkaa näytteessä. Fluoroforiksi sanotaan myös isojen makromolekyylien fluoresoimaan pystyviä funktionaalisia ryhmiä. Tässä työssä fluoroforilla tarkoitetaan lähinnä fluoresoivaa ryhmää merkkiaineissa.

Kun molekyyli viritetään tietyn aallonpituuden valolla, on muodostuva virittynyt energiatila lyhyt ikäinen. Molekyylin viritystila purkautuu hyvin nopeasti piko- tai nanosekunneissa palauttaen molekyylin takaisin alkuperäiseen perusenergiatilaan. Molekyylien ominaisuudet ja ympäristö vaikuttavat purkautumistapaan ja nopeuteen. Viritystilan purkautuminen tapahtuu yleensä säteilevien ja säteilemättömien purkautumisprosessien yhdistelmän kautta. Säteilevä purkautumisprosessi on prosessi, jossa molekyyli vapauttaa viritystilan energian fotonina. Yleisempi tilanne on säteilemätön purkaantuminen. Säteilemättömässä purkaantumisessa energia muuttuu vibraatio- ja rotaatioenergiaksi, tai kuluu ympäröivien molekyylien vuorovaikutuksissa. Tämän kaltainen viritystilan purkautuminen muuntaa viritystilan energian kokonaan molekyylien liike-energiaksi ja lämmöksi. [1]

Fluoresenssissa emissio tapahtuu muutaman nanosekunnin sisällä siitä hetkestä, kun aine on absorboinut fotonin. Fosforesenssissa emissio sen sijaan voi jatkua jopa tunteja kuten esimerkiksi analogistenherätyskellojen viisareissa. Yleensä fosfororesenssi

kestää vain muutaman sekunnin tai sekunnin murto-osan. Ajallisesta erosta voidaan päätellä, että fluoresenssissa säteilyenergian absorptio ja uudelleen vapauttaminen fluoresenssina on nopea prosessi. Fosforesenssissa sen sijaan energia on ensin varastoiduttava molekyyliin, mistä energia sitten vapautuu ajan myötä. [1]

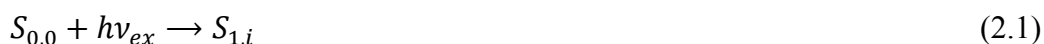


Kuva 1: Jablonskin diagrammi. Kuvaan on piirretty nuolia havainnollistamaan säteileviä ja säteilemättömiä viritystilan purkautumisreittejä. Kuvan ylöspäin kulkeva nuoli kuvaa absorptiota. Aaltounoilet kuvaavat säteilemättömiä mekanismeja, vaalean vihreä nuoli kuvaa fluoresenssia ja punainen fosforesenssia. Vaakaviivat kuvaavat elektronisten tilojen vibraatiotasoja ja paksut viivat ovat kunkin tilan alin vibraatiotaso. Mustat energiatilaviivat kuvaavat singletti perustilaa S_0 , vihreät virittynyttä singlettitilaa S_1 ja violetit viivat vastaavat alinta triplettilitilaa T_1 .

Kuvassa 1 on esitettyfluoresenssiin johtavat kolme vaihetta siinä järjestyksessä, jossa ne tapahtuvat. Aluksi molekyyli absorboi sähkömagneettista valoa, mikä virittää molekyylin elektronin korkeampaan energiatilaan. Virittymisen jälkeen molekyylin energia laskee ensin vibraatiorelaksaatiolla virittyneen energiatilan alimmalle vibraatiotasolle kuluttaen osan absorboidusta energiasta. Lopuksi jäljellä oleva viritysenenergia vapautuu fluoresenssissa fotonina. Absorptio vaiheesta voidaan mitata absorptiospektri, jossa verrataan detektorille saapuvan säteilyenergian määrää näytteen ja pelkän väliaineen esimerkiksi liuottimen läpi.

Ensimmäisessä vaiheessa merkkiaineen fluoroforiin absorboituu $E = h\nu_{ex}$:n energian foton. Absorption kannalta on välttämätöntä, että fotonin energia on sopivan suuruinen aiheuttaakseen elektronin siirtymisen energiatilalta toiselle. Fotonin energian on siis oltava yhtä suuri tai hiukan suurempi kuin energiatilojen välinen erotus. Vaikka molekyylissä olisikin sopiva energiatila, ei absorptio silti tapahdu aina. Vain

valintasääntöjen sallimat absorptiot tapahtuvat usein. Tärkein valintasääntö on elektronin kokonaisspinin S säilyvyys $\Delta S = 0$. Peruselektronitilassa molekyylin kokonaisspinkvanttiluku S on 0 ja spinnikerrannaisuus $2S + 1 = 1$. Peruselektronitilaa, jossa $S = 0$ ja spinkerrannaisuus on 1 sanotaan singlettitiloiksi. Singlettitilat merkitään kasvavan energian järjestyksessä S_0, S_1, S_3, \dots jne. Kun elektronitilan spinkerrannaisuus on 3, sanotaan tiloja triplettitiloiksi ja niitä merkitään kasvavan energian järjestyksen mukaisesti T_0, T_1, T_2, \dots . Triplettitilassa perustilalle jääneen ja tripplettitilalla olevan elektronien spinfunktioiden on myös oltava samat, jolloin molekyylin kokonaisspinkvanttiluku $S = 1$. Verrattaessa triplettitilaa vastaavan singlettitilan energiaan on triplettitilan energia aina hieman pienempi kuin singlettitilan energia: $E(T_i) < E(S_i)$. Kun perus singlettitila virittyy absorption yhteydessä, muuttuu perus singlettitila valintasäännön mukaan virittyneeksi singlettitilaksi. Elektronin tila ei siis muutu absorptiossa suoraan singlettitilasta tripletiksi tai triplettitilasta singlettiksi. Elektronitilan muutoksena esitettynä ensimmäinen vaihe on siis



missä $S_{0,0}$ on molekyylin peruselektronitilan perusvibraatiotila. $S_{1,i}$ on singlettitilan virittynyt vibraatiotila, missä i on vibraatiotason järjestysluku 0,1,2,3..., h on Planckin vakio ja ν on fotonin taajuus. [2] Yleensä absorboidussa fotonissa on suurempi energia kuin mitä tarvittaisiin perustilalta $S_{0,0}$ ensimmäisen virittyneen tilan S_1 alimmalle vibraatiotasolle siirtymiseen, joten elektroni asettuu S_1 -tilan korkeammalle vibraatiotilalle $S_{1,i}$.

Virittynyt tila säilyy yleensä vain lyhyen ajan noin 1-10 nano sekuntia. Tässä ajassa merkkiaineessa ehtii tapahtua konformaatio muutoksia ja merkkiaine on vuorovaikutuksessa ympäristönsä kanssa. Molekyyli siis muuttaa muotoaan päästäkseen ympäristönsä kanssa mahdollisimman pieneen ja stabiiliin energiatilaan eli tapahtuu vibraatiorelaksaatio, jolloin muodostuu $S_{1,0}$ -energiatila. Osa virittymisessä absorboidusta energiasta vapautuu vibraationa eli lämpönä ympäröiville molekyyleille niin, että sopiva energiatila saavutettaisiin. [3]

Molekyylin viritystila voi siis purkautua useilla eri tavoilla. Fluoresenssin ja tämän työn kannalta tärkeimmät viritystilan purkumekanismit ovat: fluoresenssi (f), sisäsiirtymä (IC), systeemien välinen siirtymä (ISC) ja fosforesenssi (p). Absorbtion jälkeen molekyyli relaxoituu vibraatiorelaksaation ja sisäsiirtymän avulla, kunnes se saavuttaa S_1 -tilan alimman vibraatiotason. Nämä prosessit eli vibraatiorelaksaatio alkuperäisen virittyneen tilan alimmalle vibraatiotasolle ja tarpeen mukaan siitä sisäsiirtymä S_1 :n samaenergiselle vibraatiotasolle, ovat niin nopeita, että ne tapahtuvat joka tapauksessa ennen muita mekanismeja noin pikosekunneissa. Sen jälkeen viritystilalla on kolme vaihtoehtoa: fluoresenssi, sisäsiirtymä tai systeemien välinen siirtymä. Vibraatiorelaksaatio on esitetty kuvassa 1 mustalla aaltonuolella virittyneeltä vibraatiotilalta perustilalle.

Fluoresenssissa molekyyli siirtyy säteilevästi alempaan saman spinkerrannasuuden elektronitilaan [2] eli molekyyli emittoi fotonin, jolloin viritys tila siirtyy ylemmältä singlettitilalta alemmalle singlettitilalle

$$S_{1,0} \rightarrow S_{0,i} + hv_f \quad (2.2)$$

missä hv_f on fotonin energia, $S_{1,0}$ on ensimmäisen virittyneen singlettitilan alin taso ja $S_{0,i}$ on molekyylin perustilan vibraatiotaso. Molekyyli ei tosin aina palaudu fluoresenssissa suoraan perusenergiatilalle vaan jää hetkeksi perustilan ylemmälle vibraatiotilalle. Vibraatiotila purkautuu nopeasti perustilalle molekyylien vuorovaikutusten kautta. Fluoresenssi voi tapahtua myös korkeampien singlettitilojen välillä esimerkiksi $S_{3,0} \rightarrow S_{2,i}$. Fluoresenssi ei siis rajoitu ainoastaan tiloille yksi ja nolla mutta tämä on kuitenkin erittäin harvinaista. [1] Fluoresenssi on merkitty Jablonskin diagrammiin kuvassa 1 vihreällä nuolella virittyneeltä singlettitilalta $S_{1,0}$ perustilalle $S_{0,0}$. Yhtälössä 2.2 esitetyn prosessin nopeus v_f voidaan ilmaista myös yhtälöllä

$$v_f = k_f[S_{1,0}] \quad (2.3)$$

missä $[S_{1,0}]$ on virittyneen singlettitilan konsentraatio ja k_f on fluoresenssin reaktionopeusvakio. Purkautuvan energian määrä riippuu myös virittyvää molekyyliä ympäröivistä muista aineista. Ympäröivät molekyylit eivät yleensä pysty vastaanottamaan ylemmän singlettitilan $S_{1,0}$ ja perustilan $S_{0,i}$ energioiden erotusta, joten energia ehtii purkautua fluoresoimalla.

Sisäsiirtymä (IC) on saman spinkerrannaisuuden tilojen välinen unimolekulaarinen säteilemätön siirtymä [2]. Jos ylemmän ja alemman singlettitilan vibraatiotilat ovat samalla energiatasolla, voi ylemmällä singlettitilalla oleva elektroni siirtyä alemmalle. Sama voi tapahtua triplettitilojenkin välillä kuten esimerkiksi

$$S_{1,0} \rightarrow S_{0,i} \rightarrow S_{0,0} + q \quad (2.4)$$

$$T_{2,0} \rightarrow T_{1,i} \rightarrow T_{1,0} + q \quad (2.5)$$

Kun siirtymä tapahtuu, on molekyyli virittyneessä vibraatiotilassa. Viritystilan energia purkautuu hyvin nopeasti vibraatiorelaksaaation kautta muuttuen ympäristön lämmöksi. Kuvaan 2 IC on piirretty keltaisena aaltonuolena vasemmalle. [1][2]

Systeemien välinen siirtymä (ISC) on myös molekyylin sisäinen säteilemätön siirtymä kuten IC mutta eri spinkerrannaisuuden tilojen välillä

$$S_{1,0} \rightarrow T_{1,i} \rightarrow T_{1,0} + q \quad (2.7)$$

$$T_{1,0} \rightarrow S_{0,i} \rightarrow S_{0,0} + q \quad (2.8)$$

ISC:ssä molekyylin spinkerrannaisuus muuttuu singletttilasta tripletiksi tai triplettitilasta singletiksi. Elektronin spintilan muuttaminen tekee ISC:stä huomattavasti hitaamman kuin IC. ISC:n voidaan olettaa olevan tärkeä, kun molekyyli sisältää hiiltä raskaampia atomeja kuten rikkiä (S). ISC on esitetty kuvassa 2 sinisenä oikealle kulkevana aaltonuolena. [1][2]

Fosforesenssi on säteilevä siirtymä alemman energian tilalle, jonka spinkerrannaisuus on erilainen kuin lähtötilan [2]. Fosforesenssi on siis vastaavanlainen säteilevä siirtymä kuin fluoresenssi mutta erona on se, että fosforesenssissa siirrytään triplettitilalta singletttilalle



Tällaiset siirtymät ovat säännön 2.1 mukaan kiellettyjä. Valinta sääntö (2.1) perustuu approksimaatioon, jossa spinrata vuorovaikutus on asetettu nolaksi. Käytetty approksimaatio on hyvä, mutta ei kuitenkaan täysin vastaa todellisuutta, minkä johdosta valintasääntö (2.1) ei ole ehdoton. Jos ei ole nopeampia kilpailevia prosesseja, fosforesenssi tapahtuu, vaikkakin paljon hitaammin kuin fluoresenssi, joka on vastaava sallittu siirtymä. Fosforesenssin relaksaatioaika on 10^2 - 10^{-3} s, kun fluoresenssin relaksaatioaika on 10^{-6} - 10^{-11} s. Fosforesenssi on esitetty kuvassa 2 oranssina nuolena T_1 :ltä S_0 :lle. [2]

Edellä esitetyistä mekanismeista fluoresenssin elinaika mittausten (FLIM) kannalta olennaisimmat ovat fluoresenssi, sisäsiirtymä ja systeemien välinen siirtymä. Näiden kolmen reaktionopeus vakioita käytetään fluoresenssin elinajan määrittämisessä. [2][4][5].

Fluoresenssin kvanttisuhde (fluoresence quantum yield), mikä on emittoitujen fotonien määrän suhde absorboitujen fotonien määrään nähden, on edellä mainittujen prosessien suhteellisen tehokkuuden mitta. Kvantisuhteen arvo on aina välillä $0 \leq \phi \leq 1$.

$$\Phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (2.9)$$

Kun systeemissä on läsnä ainetta, joka aiheuttaa fluoresenssin intensiteetin pienenemisen, tätä prosessia kutsutaan sammuttamiseksi (quenching). Sammutus voi olla joko haluttu prosessi tai ei haluttu sivureaktio. Haluttuja sammutus prosesseja ovat esimerkiksi energian- tai elektroninsiirto prosessit. Ei halutut reaktiot ovat sellaisia reaktioita, jotka heikentävät halutun valokemiallisen reaktion kvanttisuhdetta. Sammutuksen vaikutuksia voidaan tutkia tarkkailemalla valokemialliseen reaktioon liittyvän virittyneen tilan emissioita.

Virittynen singlettitilan tai tripletitilan kaksimolekulaariselle sammutukselle on kolme yleistä mekanismia: törmäyksien aiheuttama sammutus (2.12), resonanssi energian siirto (2.13) ja elektronin siirto (2.14)



Törmäyksien aiheuttama sammutus on erityisen tehokasta, kun Q on raskas aine (heavy species), kuten jodi-ioni. Sammuttaja vastaanottaa virittyneeltä molekyyliltä energiaa ja purkaa saadun energian IC:n ja vibraatiorelaksaation avulla. Tätä ominaisuutta voidaan käyttää hyväksi selvittämään, onko fluoresoiva aminohappo proteiinin hydrofiilisessa pintakerroksessa vai hydrofobisessa ytimessä. Esimerkiksi tryptofaanin fluoresenssi (absorboi noin 290 nm aallonpituudella ja emittoi noin 350 nm aallonpituudella) sammuu jodi-ionin avulla, kun tryptofaani on proteiinin pinnalla kosketuksissa liuottimen kanssa. Jos tryptofaani on sen sijaan proteiinin hydrofobisessa osassa suojattuna, ei jodi-ioni pääse sammuttamaan sen fluoresenssia. [1]

FLIM on myös vähemmän herkkä kuin intensiteetti mittaukset fluoroforien hajoamisen (photobleaching), näytteen epätasaisen valaisun, valon kulkeman matkan ja viritystilan intensiteetin vaihtelun suhteen. Sammutajien laaja valikoima ja molekyylien väliset vuorovaikutukset aiheuttavat muutoksia fluoroforien fluoresenssin elinajassa mutta eivät aiheuta siirtymiä spektrissä. Tämän lisäksi Förster resonanssi energia siirron (FRET) mekanismia voidaan hyödyntää merkkiaineiden valmistuksessa. FRET:iä käyttäen voidaan tehdä merkkiaineita erilaisille tutkittaville analyyteille (analyte). Erityisesti sellaisille analyyteille, joille ei ole löydetty suoraan kohdistettuja merkkiaineita kuten esimerkiksi glukosille, voidaan näin tehdä sopivia merkkiaineita. [4][5]

Försterin resonanssienergiansiirto (FRET) on kahden fluoresoivan molekyylin välinen sammutusprosessi, jossa donorin virittyneen energiatilan energia siirtyy säteilemättömästi perusenergiatilassa olevalle akseptori molekyylille. Ilmiö perustuu dipoli–dipoli kytkentä (coupling) prosessiin, jonka Förster selvitti vuonna 1946. Energian siirto tapahtuu vain silloin, jos donori ja akseptori fluoroforit ovat tarpeeksi lähellä toisiaan eli yleensä alle 10 nm päässä toisistaan ja donorin emissiospektri sekä akseptorin absorptiospektrit ovat osittain samalla aallonpituusalueella. Mikäli fluoroforien spektrit ole osittain päällekkäin, ei energian siirtoa tapahdu. Lisäksi akseptorin ja donorin siirtymien dipolimomentit eivät saa olla kohtisuorassa toisiaan vasten. Lopuksi siirtymän täytyy säilyttää energiatilan kerrannaisuus. Singlettitilan transitio tripletitilalle on kielletty, sillä se vaatisi spinin kääntymisen. FRET:n tehokkuus on kääntäen verrannainen donorin ja akseptorin väliseen etäisyyden kuudenteen potenssin. [4][5]

2.2. Fluoresenssin elinaika

Näytteen fluoresenssin elinaika τ on se aika, jossa virittyneiden molekyylien konsentraatio pienenee $1/e$ osaan alkuperäisestä, missä e on Neperin luku eli noin 2,718282. Elinajan voi myös laskea tilasta pois vievien nopeusvakioiden käänteisarvona. Tilan elinaika sisältää kaikkien tilasta pois johtavien prosessien vaikutuksen. Nopeat prosessit vaikuttavat elinaikaan enemmän kuin hitaat. Jos tila purkautuu vain yhdellä unimolekulaarisella prosessilla, on tilan elinaika sama kuin kyseisen prosessin relaksaatioaika.

Fluoresenssin elinaikaa laskettaessa huomioidaan molekyylin viritystilojen purkautumis- prosesseista pääasiassa fluoresenssi (f), sisäsiirtymä (IC) ja systeeminvälinen siirtymä (ISC). Fluoresenssin elinajan yhtälö on

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_{nr}} = \frac{1}{k_f + k_{ic} + k_{isc}} \quad (2.15)$$

missä k_f fluoresenssinnopeusvakio, k_{nr} on säteilemättömien (non radiative) reaktiomekanismien nopeusvakioiden summa. Säteilemättömiä mekanismeja fluoresenssia määritettäessä ovat k_{ic} sisäsiirtymä ja k_{isc} systeeminvälinen siirtymä nopeusvakio. [4]

Virittämisen jälkeen monien fluoroforien intensiteetin vaimeneminen noudattaa eksponentti funktiota

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (2.16)$$

missä I_0 on intensiteetti ajanhetkellä $t = 0$ ja τ on elinaika. [4]

Yhtälö 2.16 pätee ideaalitapauksissa, joissa merkkiaine on tasaisesti jakautuneena näytteessä, mutta biologisissa näytteissä kuten soluissa merkkiaineen tasainen jakautuminen on epätodennäköistä. Fluoresenssin elinaikojen määrittämiseen soluissa tarvitaan usean eksponenttifunktion summa

$$I(t) = \sum_{i=1}^n a_i \times e^{(-t/\tau_i)} \quad (2.17)$$

missä τ_i on elinaika ja a_i on vastaava amplitudi ajanhetkellä $t = 0$. Muuttuja n vastaa fluoroforin erilaisten ympäristöjen määrää. [6]

On olemassa useita menetelmiä, jotka hyödyntävät fluoresoivien merkkianeiden fluoresenssia eri parametrien määrittämiseen. Taulukossa 1 on esitetty mahdollisesti tutkittavia parametreja, millä menetelmillä muuttujaa tutkitaan ja mittaukseen soveltuvia olevia fluoroforeja. Näiden menetelmien joukosta eräs on FLIM eli fluoresenssi elinaika mikroskopia. Fluoresenssi elinaika mikroskopia soveltuu hyvin kuvantamaan

merkkiaineiden ja ympäristön vuorovaikutusta elävissä soluissa. FLIM:stä on kehitetty useampia eri teknisiä toteutuksia, mutta kaikki niistä keskittyvät sellaisiin valokemiallisiin tapahtumiin, joita on vaikea havainnoida fluoresenssin intensiteetin avulla. Tämä johtuu siitä, että fluoresenssin elinaika ei riipu fluoroforien konsentraatiosta solun sisällä. Fluoresenssin elinaikamittaukset ovat vähemmän alttiita näytteessä sironneelle valolle. Vertailuna fluoresenssin intensiteettiin perustuvat mittaukset ovat varsin herkkiä sironneen valon suhteen. [4][5] Intensiteetin määrittäminen elävästä näytteestä ei ole yksinkertaista. Fluoresoivien merkkiaineiden intensiteetti ei aina muutu selkeästi ja lineaarisesti, kun yhtä parametria muutetaan. Tämä johtuu parametrien yhteisvaikutuksista merkkiaineen kanssa.

Taulukko 1: Fluoresoivien merkkiaineiden käyttökohteita. Taulukossa on esitetty havaittava ominaisuus, millä parametrilla kyseistä ominaisuutta tutkitaan ja muutamia tutkimukseen soveltuvia merkkiaineita. (Taulukko on muokattu lähteen [5] taulukon pohjalta.)

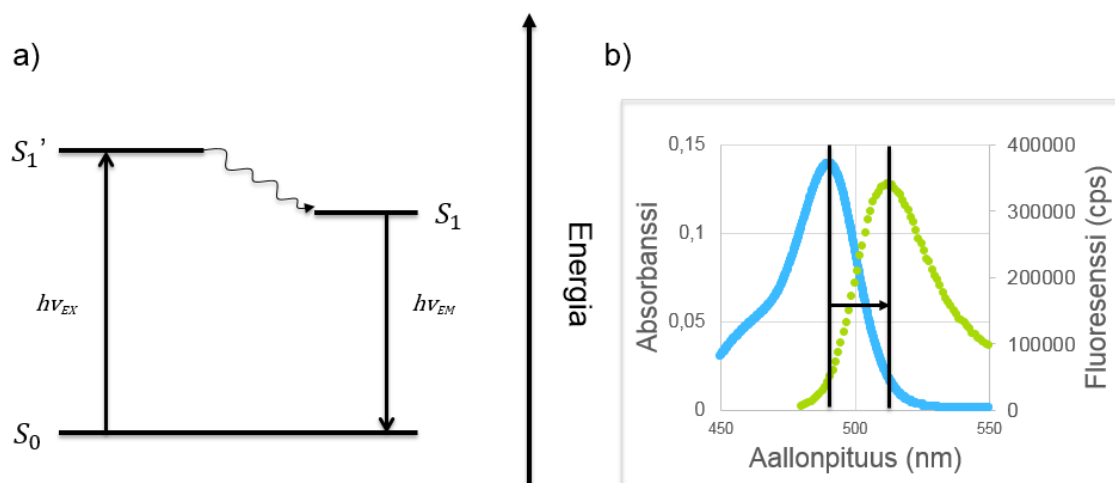
Havaittava ominaisuus	Määrittämiseen käytettävä parametri	Käytetty fluorofori	Lähteet
Molekyylin sisäiset tai molekyylienväliset vuorovaikutukset			
Hetero-FRET	elinaika, spektri, polarisaatio	useita	[22], [23], [24], [25], [26], [27], [28], [29]
Homo-FRET	polarisaatio	useita	[30], [31], [32], [33], [34], [35], [36]
Fyysiset parametrit			
Viskositeetti	polarisaatio	useita	[37], [38], [39]
Viskositeetti	lifetime of fluorescent molecular rotors	BODIPY-C ₁₂ , DCVJ, CCVJ, tioflaviini T, DASMPI, Cy väriaineet	[40], [41], [42], [43], [44], [45], [46], [47], [48], [49], [50], [51], [52], [53], [54], [55], [56]
Polaarisuus	elinaika, spektri	niilin punainen, laurdan, prodan di-4-ANEPPDHQ	[57], [58], [59]
Lämpötila	fluoresenssin elinaika	kiton red, rhodamine B, lämpötila herkät polymeerit	[61], [62], [63], [64], [65]
Taitekerroin	fluoresenssin elinaika	GFP, kvanttipisteet, nanotimantit	[65], [66], [67], [68], [69], [70], [71], [72]
Liuenneen aineen tai fluoroforin konsentraatio			
pH		BCECF	[73], [74], [75], [76], [77], [78], [79], [80]
O ₂	fluoresenssin elinaika	ruteenikompleksit, iridium, osmium, renium	[81], [82], [83], [84]

Ca ²⁺	intensiteetti, elinaika	kalmoduliinin havaitseminen GFP, Quin-2, kalsium vihreä ja johdannaiset	[85, [86], [87], [88], [89], [90], [91]
Cl ⁻	fluoresenssin elinaika	6-Metoksikinolyyli-asetoetyyliesteri (MQAE)	[92], [93], [94], [95]
Cu ²⁺	fluoresenssin elinaika	Oregon vihreä tai GFP-FRET sensori	[96], [97], [98]
Na ⁺	fluoresenssin elinaika	SBFI, natrium vihreä	[99], [100]
K ⁺	fluoresenssin elinaika	PBFI	[100]
Mg ²⁺	fluoresenssin elinaika	Mag-quin-2, magnesium vihreä	[101]
PO ₄ ³⁻	fluoresenssin elinaika		[102]
NO	fluoresenssin elinaika		[103]
luontaisen fluoroforin konsentraatio (intrinsic)	fluoresenssin elinaika	NADH, FAD	[104], [105], [106], [107]
ulkoisen fluorofori konsentraatio (extrinsic)	fluoresenssin elinaika		[108], [109], [110], [111], [112], [113], [114], [115], [116], [117], [118], [119], [120]
glukoosi	fluoresenssin elinaika	rutenium-malakiitti vihreä FRET, glukoosi/galaktoosisitoutuva proteiini (GBP) merkitty Badan	[121], [122], [123]

FLIM on myös vähemmän herkkä kuin intensiteetti mittaukset fluoroforien hajoamisen (photobleaching), näytteen epätasaisen valaisun, valon kulkeman matkan ja viritystilan intensiteetin vaihtelun suhteen. Sammuttajien laaja valikoima ja molekyylien väliset vuorovaikutukset aiheuttavat muutoksia fluoroforien fluoresenssin elinajassa mutta eivät aiheuta siirtymiä spektrissä. Tämän lisäksi Förster resonanssi energia siirron (FRET) mekanismia voidaan hyödyntää merkkiaineiden valmistuksessa. FRET:iä käyttäen voidaan tehdä merkkiaineita erilaisille tutkittaville analyyteille (analyte). Erityisesti sellaisille analyyteille, joille ei ole löydetty suoraan kohdistettuja merkkiaineita kuten esimerkiksi glukoosille, voidaan näin tehdä sopivia merkkiaineita. [4][5]

2.3. Ympäristön vaikutukset fluoresoivan merkkianeen fluoresenssiin

Moni ympäristö tekijä vaikuttaa fluoresenssin ominaisuuksiin. Kolme yleisintä vaikuttajaa ovat: liuottimen poolisuus, sammuttajien läheisyys ja konsentraatio sekä pH vesiliuoksissa. Liuottimiin lasketaan mukaan myös soluelinten sisällä olevat liuokset, solukalvot ja muut rakenteet. Fluoresenssispektri voi olla hyvin riippuvainen liuottimesta. Ympäristö voi vaikuttaa fluoresoivaan molekyyliin muuttamalla fluoresenssispektrin aallonpituusaluetta, leveyttä ja/tai fluoresenssin tehokkuutta. Aallonpituuden siirtymä (kuva 3) voi johtua liuottimen uudelleen järjestäytymisestä. Fluorofori on yleensä dipoli. Kun fluorofori virittyy, muuttuu fluoroforin dipolimomentti. Liuotin molekyylit reagoivat virittyneen fluoroforin dipolimomentin muutokseen järjestäytymällä uudelleen. Osa fluoroforin virityksessä absorboidusta energiasta kuluu tähän, jotta ympäristö saavuttaisi minimi energian tasapainon. Kun fluorofori fluoresoi, on fotonin energia $E = \frac{h}{\lambda}$ pienempi kuin Jablonskin diagrammin mukainen $S_{1,0} \rightarrow S_{0,0}$ -siirtymä, joten fluoresenssispektri on siirtynyt suuremmalle aallonpituudelle. Mitä suurempi dipolimomentti virittyneellä fluoroforilla on, sitä suurempi on aallonpituuden kasvu. Stokesin siirtymä on tärkeä fluoresenssi tekniikoiden herkkyyden kannalta, koska se mahdollistaa fluoresenssin mittaamisen viritysvaaloa pidemmillä aallonpituuksilla, jolloin viritysvaalo ei häiritse mittauksia. [3] Verrattuna absorptiospektrometriaan, missä on mitattava näyte ja vertailunäyte tuloksia varten, Stokesin siirtymän ansiosta fluoresenssi mittauksissa tarvitsee mitata vain näyte. Absorptiospektrometriassa mitataan sekä näytteen että liuottimen spektrit.



Kuva 3 Stokesin siirtymä. a) Kuvassa on Jablonskin diagrammi esittämässä stokesin siirtymää. Molekyylin absorboiman fotonin energia on $h\nu_{EX}$ ja emitoidun fotonin energia on $h\nu_{EM}$. Stokesin siirtymä on aaltoviiva energia tasojen S_1' ja S_1 välissä. oikeanpuoleisessa kuvassa Stokesin siirtymä on esitetty fluoresiinin absorptio- ja fluoresenssispektrien avulla. b) Kuvassa on fluoresiinille mitatut absorptio- (sininen) ja emissiospektrit (vihreä). Näiden välinen Stokesin siirtymä on esitetty mustalla. Mitatun näytteen fluoresiinin konsentraatio oli $c = 1,808 \times 10^{-6} \text{ M}$. Liuottimena näytteessä käytettiin 0,1 M NaOH liuosta. Mittauksessa käytettyviritysaallonpituus oli 470 nm.

Muutamia yleisiä esimerkkejä aineista, jotka voivat aiheuttaa fluoresenssin sammutusta, ovat happimolekyylit, jodi- ja kloori-ionit. Fluoresoivien molekyylien sammutus ja aktivointi tietyn ympäristö ominaisuuden vaikutuksesta mahdollistaa kyseisen ympäristöominaisuuden mittaamisen fluoresoivilla merkkiaineilla. Mitä tasaisemmin fluoresenssin intensiteetti muuttuu esimerkiksi Cl^- -ionin konsentraation kasvaessa, sitä paremmin merkkiainetta voidaan käyttää Cl^- :n konsentraation mittaamiseen. Sammutusmekanismeilla reagoivia merkkiaineita käytetään esimerkiksi happimolekyylien ja halidi-ionien konsentraatioiden määrittämiseen fluoresenssi elinaikamikroskopiassa. [4][5]

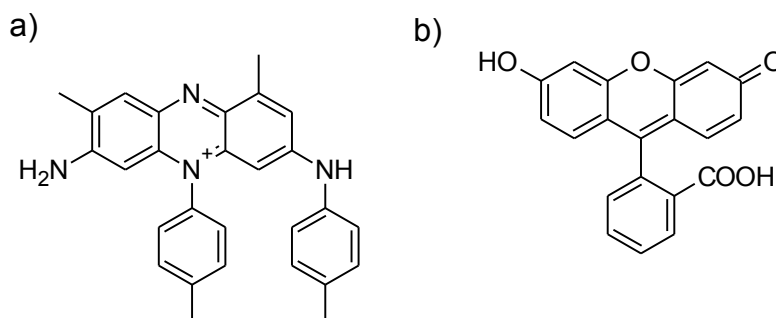
3. FLUORESOIVAT MERKKIAINEET

Fluoresoivia merkkiaineita on tarjolla kaupallisesti moniin eri käyttökohteisiin ja jopa solunsisäisiin määrittäisiin [3][6]. Fluoresoivilla merkkiaineilla voidaan määrittää merkittyjen molekyylien sijainti, ympäröivien molekyylien vuorovaikutusta, metallisten ionien konsentraatiota, lämpötilaa, pH:ta tai muita mahdollisia parametreja. Merkkiaineet eivät kuitenkaan toimi kaikissa olosuhteissa kuten liian suurilla tai pienillä ympäristön pH:lla sekä, jos ympäristön molekyylien aiheuttama taustafluoresointi on hyvin voimakasta merkkiaineen emissio aallonpituuksilla. Kaikki merkkiaineet eivät myöskään sovellu kaikille mittauslaitteistoille viritysaallonpituuksien takia. Jos merkkiaine ei absorboi merkittävästi laitteiston käyttämällä viritysaallonpituudella, ei merkkiaineen fluoresenssia voida mitata. Tässä luvussa käydään ensin läpi merkkiaineita hiukan yleisemmällä tasolla, minkä jälkeen perehdytään työn kannalta kiinnostavien merkkiaineiden rakenteeseen ja toimintaan.

3.1. Fluoresoivat merkkiaineet yleisesti

Fluoresoivat merkkianemolekyylit sisältävät yleensä useita aromaattisia ryhmiä, joissa on π -sidoksia. Fluoresoiva proteiini tai orgaaninen väriaine voidaan konjugoida suoraan tutkittavaan molekyyliin. Tämä tekee niistä ideaalisia esimerkiksi lääkeaineiden jäljittämiseen elävissä soluissa.

Fluoresoivia mineraaleja ja luonnossa esiintyviä fluoresenssimerkkiaineita on tunnettu jo pitkään. Yksi tunnetuimmista luonnollisista fluoresoivista merkkiaineista on *aequora victoria* -meduusoista löydetty GFP (green Fluorescent Protein) eli vihreä fluoresoiva proteiini. Ensimmäinen synteettinen merkkiaine oli malvanväri (kuva 4 a), minkä valmisti William Henry Perkin Manchesterissä vuonna 1856 [5]. Värillä oli pieni kvanttisuhde. Vähän myöhemmin vuonna 1871 Adolf von Baeyer valmisti huomattavasti kirkkaamman merkkiaineen fluoreseiinin (fluorescein, kuva 4 b) [5]. Fluoresiinista on tehty monia modifikaatioita, joita käytetään nykyisin fluoresoivina merkkiaineina eri sovelluksissa. Fluoresiinista on saatavilla useita kaupallisia versioita.



Kuva 4 Malvanvärin ja fluoressiinin rakennekaavat. Kuvassa on esitetty rakennekaavat a) malvanvärille ja b) fluoressiinille.

Kofaktoreita, kuten klorofyllit ja flavinit, lukuun ottamatta suurin osa proteiinien rakenteista ja nukleiinihapoista ei fluoresoi voimakkaasti. Neljä merkittävää poikkeusta ovat aminohapot tryptofaani, tyrosiini, fenyylialaniini ja serine—tyrosiini—glysiini-yhdistelmän hapettunut muoto, joka tunnetaan myös GFP:nä. Tryptofaani ja tyrosiini absorboivat noin 274 nm:n kohdalla ja fluoresoivat vedessä 303 nm:n lähellä. Vastaavasti fenyylialaniini absorboi 257 nm:ssä ja fluoresoi vedessä 282 nm:n aallonpituudella. Luontainen GFP (wild type GFP), jota saadaan *Aequora victoria* -meduusasta, absorboi voimakkaasti 395 nm:n aallonpituudella ja emittoi maksimissaan 509 nm:n aallonpituudella. [1]

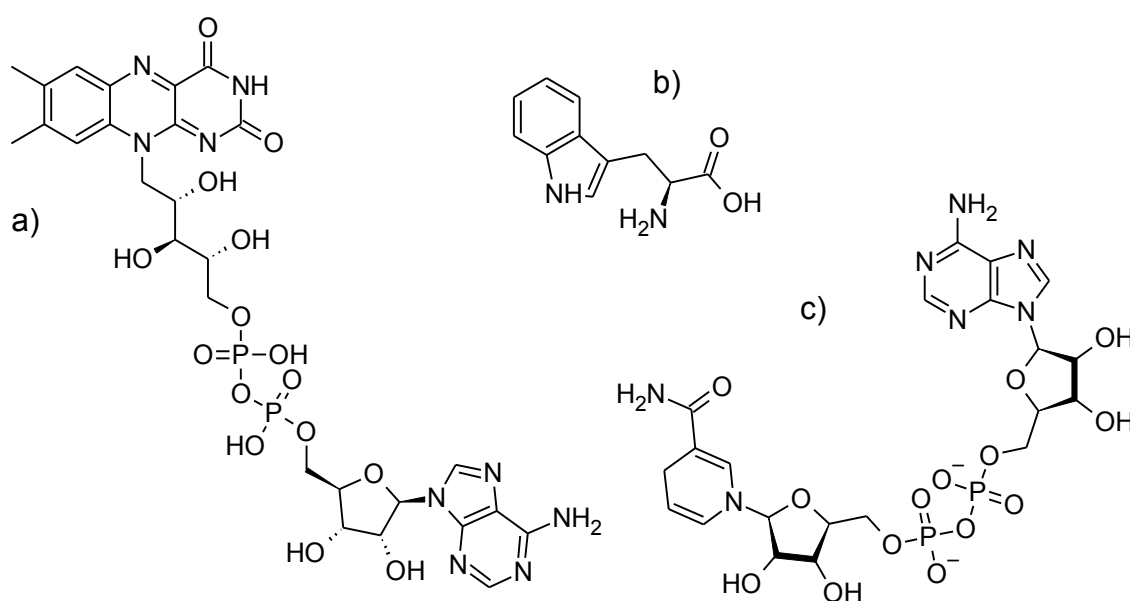
Nykyisin fluoresenssimittaukset ja mikroskopia voidaan suorittaa leimaamalla näyte fluoresoivilla merkkiaineilla, fluoresoivilla proteiineilla, kvanttipisteillä tai muilla fluoresoivilla nanopartikkeleilla. Elävien solujen toimintoja voidaan kuvata fluoresenssimikroskopiolla lisäämällä sopiva määrä fluoresoivaa merkkiainetta solussa haluttuihin rakenteisiin ja mittaamalla fluoresenssin intensiteetin jakautumista mittausalueella. Solun osat, joihin merkkiaine voidaan lisätä, ovat esimerkiksi proteiinit, nukleiinihapot ja solukalvot. Kun viritysväli ja sironta suodatetaan huolellisesti pois, on mahdollista kerätä näytteestä valo, joka on vain merkkiaineiden fluoresenssia. [1]

Näytteissä, kuten soluissa, luontaisesti esiintyviä fluoresoivia molekyylejä eli autofluoresenssia voidaan myös suoraan hyödyntää mittauksissa. Fluoresoivia merkkiaineita, kvanttipisteitä ja muita nanopartikkeleita sovelletaan solututkimuksessa suuren fluoresenssin kvanttisuhteen, vähäisen fluoresoivan merkkiaineen hajoamisen (photobleaching) ja kapean koosta riippuvan emissiospektrin takia. Biologiassa yleisesti käytetyt merkkiaineet ovat orgaanisia fluoroforeja ja geneettisesti koodattuja fluoresoivia proteiineja. Biologit käyttävät hyväkseen tutkimuksessa myös solujen omia fluoresoivia pystyviä molekyylejä, kuten esimerkiksi tryptofaania, melaniinia ja keratiinia, solujen kuvantamiseen. Kasvisoluissa fluoresoijana käytetään usein klorofyllia.

Fluoresenssin elinajan riippuvuus ympäristöolosuhteista toimii perustana monelle fluoroforien käyttösovellukselle. Yleisimmät käyttösovellukset ovat proteiinien vuorovaikutusten mittaaminen FRET:llä, biologisesti merkittävien ionien konsentraation määrittäminen, pH:n, paikallisen viskositeetin, poolisuuden tai lämpötilan mittaaminen (taulukko 1). Elinaikamittauksia käytetään myös esimerkiksi biologisesti merkittävien molekyylien, kuten glukoosin, konsentraation määrittämiseen. [5]

3.2. Fluoresoivien merkkiaineiden rakenne ja toiminta

Kuten aikaisemmin todettiin, on fluoresoivia molekyylejä useita erilaisia. Kaikki merkkiaineet eivät kuitenkaan sovellu solujen ja elävien organismien tutkimiseen, koska ne ovat eliöille mahdollisesti myrkyllisiä tai merkkiainemolekyylit eivät liukene veteen, koska molekyylit ovat poolittomia. Koska solulimasta eli sytoplasmasta keskimäärin 80 – 85 % on vettä [7], tulisi merkkiaineiden olla ainakin osin veteen liukenevia.



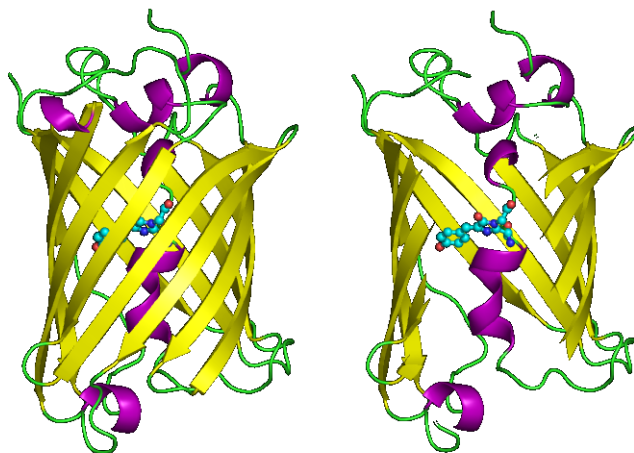
Kuva 5 Autofluoresoivien molekyylien rakennekaavat. Kuvassa on esitetty a) FAD:n, b) tryptofaanin ja c) NADH:n rakennekaavat. NADH on pelkistetyssä muodossa. (Rakenteet on piirretty ChemsSketch-ohjelmalla.)

Eläville soluille harmittomimmat merkkiaineet ovat todennäköisesti fluoresoivat proteiinit ja soluissa itsessään esiintyvät autofluoresoivat molekyylit. Soluissa ja kudoksissa esiintyviä autofluoresoivia molekyylejä ovat esimerkiksi nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi (NADH), flaviiniadeniinidinukleotidi (FAD) ja aminohapot, jotka sisältävät aromaattisen osan, kuten tryptofaani. [8] Vastaavanlaisia kromoforeja, jotka ovat osana solujen aineenvaihduntaa, on organismeissa useita erilaisia. Autofluoresoivilla kromoforeilla on karakteristiset absorptio- ja emissiospektrit, joten kromoforit erottuvat toisistaan fluoresenssi mittauksissa, kun viritys ja monitorointiaallonpituudet on valittu oikein. Autofluoresoivien molekyylien koko vaihtelee (kuva 5), mutta yhteistä kaikille näille molekyyleille on aromaattinen osa. Virityksessä absorboidusta energiasta osa kuluu molekyylin sisäisiin prosesseihin ja osa voi kulua molekyylien välisissä vuorovaikutuksissa. On kuitenkin olemassa myös

fluoresoivia merkkiaineita, joissa fluorofori on suojattu niin, ettei ympäristö pääse suoraan vaikuttamaan fluoresointiin.

Nanopartikkelit ja kvanttipisteet eivät tällä hetkellä vielä sovellu kovin hyvin solunsisäisiksi merkkiaineiksi, koska monet niiden rakenteiden ytiminä käytetyistä epäorgaanisista puolijohteista ovat myrkyllisiä eliöille [9]. Tämän lisäksi nanopartikkelit ovat poolittomia, johtuen niiden pallomuodosta ja yhtenäisestä rakenteesta, joten nanopartikkelit ja kvanttipisteet eivät sellaisenaan sovellu poolisiin liuottimiin kuten veteen. Nanopartikkelien hyvänä puolena ovat suurempi kirkkaus verrattuna perinteisiin fluoresoiviin merkkianeisiin ja ominaisuuksien muokattavuus. Muuttamalla nanopartikkelien kokoa, ytimen materiaalia ja pinnoitetta, voidaan nanopartikkelin toimintaparametreja säätää halutun laisiksi. Kun sopivia eliöille vaarattomia puolijohteita ja pinnoitteita löydetään, voidaan nanopartikkeleita käyttää laajemmin myös solujen tutkimiseen. Nanopartikkeleita on tehty myös käyttäen kemiallisesti inerttiä piidioksidin nanorakennetta ja lisäämällä rakenteeseen fluoresoivia merkkiaineita [10].

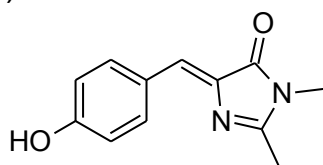
Aequorea victoria -meduusasta löydetty vihreä fluoresoiva proteiini (GFP) on osoittautunut hyväksi merkkiaineeksi solujen tutkimiseen. GFP:stä on kehitetty useita eri mutantteja lisäten merkkianeen käyttöominaisuuksia kuten esimerkiksi haluttu siirtymä fluoresenssin aallonpituudessa tai voimakkaampi fluoresenssin intensiteetti. [11] Kyseisellä proteiinilla on myös pH-herkkiä mutantteja. GFP on proteiini, jossa fluorofori sijaitsee beetalaskoksen muodostaman tynnyrimäisen kuoren sisällä (kuva 6). Fluorofori on beetatynnyrissä (beta barrel) hyvin suojattu ulkoisilta häiriöiltä kuten ioneilta, ympäristön proteiineilta ja muilta fluoresenssia sammuttavilta tekijöiltä. Beetatynnyri on yhteydessä fluoroforiin vetysidoksilla. Fluoroforin toimintaan voidaan vaikuttaa muuttamalla muokkaamalla suojaavan tynnyrin pinnan rakennetta. Kun pintarakenne reagoi ulkoiseen tekijään esimerkiksi pH-muutokseen, muuttuvat myös fluoroforin vetysidokset niin, että fluoresenssin intensiteetti tai elinaika muuttuu. GFP:n ominaisuuksia voi muokata aiheuttamalla piste mutaatioita GFP:tä koodaavassa geenissä [11].



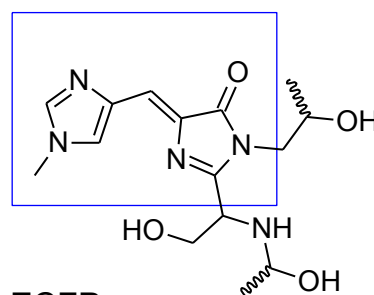
Kuva 6 GFP:n rakenne. GFP:n fluorofoori sijaitsee beetatynnyrin (beta barrel) sisällä ja on näin hyvin suojattu ulkoisilta tekijöiltä. Fluorofoori on esitetty pallo ja tikku mallilla ja näkyy selvästi oikeanpuoleisessa kuvassa, josta on leikattu osa beetatynnyriä pois. (Kuvan on tehnyt Raymond Keller ja kuva on lainattu wikipedian GFP artikkelista.)

GFP:stä on mutaatioiden avulla tuotettu myös kahdeksan erilaista fluoroforia: enhanced GFP, blue fluorescent protein (BFP), cyan fluorescent protein (CFP), citrine and yellow fluorescent protein (YFP). Punainen fluoresoiva proteiini (RFP) kloonattiin punaisesta *corallista discosoma sp.*:stä RFP:n ongelmana on se, että RFP on tetramerinen eli neljä RFP:tä sitoutuu toisiinsa muodostaen lopullisen merkkiaineen. Proteiinin muodostuminen on siis hidasta ja tämän lisäksi RFP on hyvin myrkyllinen soluille. RFP:stä on jalostettu edelleen kolme monomeeristä versiota, jotka tunnetaan nimillä Redstar, mCherry ja mOrange. [12] GFP:stä muunnetuista fluorofooreista on muitakin mutaatioita mutta edellä mainitut kahdeksan edustavat eri värimuunnoksia eli ne eroavat viritys- ja emissioaallonpituuksiltaan. Eri värimuunnosten emissiot tapahtuvat nimien kuvaamalla näkyvän valon alueilla. Kuvassa 7 on esitetty neljän GFP muunnoksen fluorofoorit. Kuten kuvasta näkee, fluoroforien perusrakenne on sama: kaksi rengasrakennetta kiinnittyneenä yhden hiilen välityksellä. Viisi atominen rengas, joka on yhteydessä aminohappoketjun edelliseen ja seuraavaan jäseneseen, on saman tyyppinen kaikissa viidessä rakenteessa. Jokaisessa rengasrakenteessa on typpi paikoilla 1 ja 3.

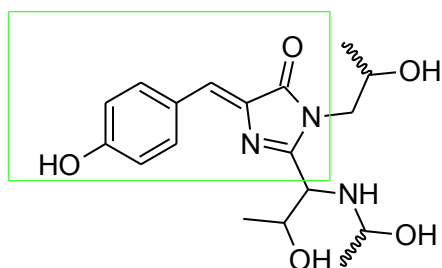
a) GFP



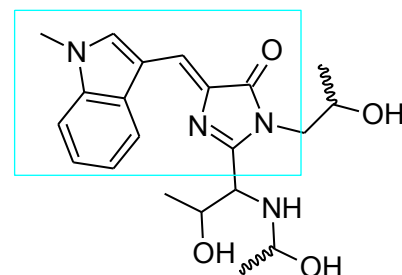
b) EBFP



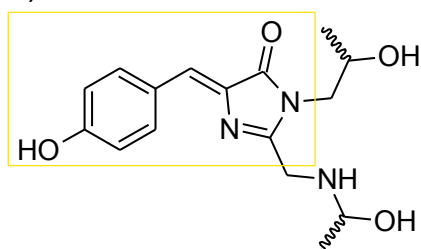
c) EGFP



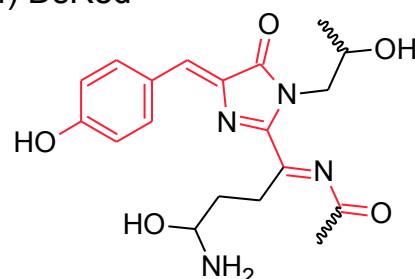
d) ECFP



e) EYFP



f) DsRed



Kuva 7 GFP:n fluorofori ja GFP:stä muunnettuja fluoroforeja. Kuvassa on esitetty neljä *Aequorea victoria* -meduusasta saadun GFP:n fluoroforin mutaatiota. Rakennekaavoihin b)-e) on merkitty fluorofori nimeä vastaavalla ruudulla. DsRed:n muodon takia fluorofori on merkitty punaisilla viivoilla ruudun sijaan. GFP:n rakennekaava on artikkelin [13] mukainen ja rakenteet b)-f) on piirretty lähteen [14] kuvia mallina käyttäen. Kaksoissidosten paikat tarkistettu artikkelin [15] kuvasta. Rakenteet on piirretty ChemsSketch:ä käyttäen.

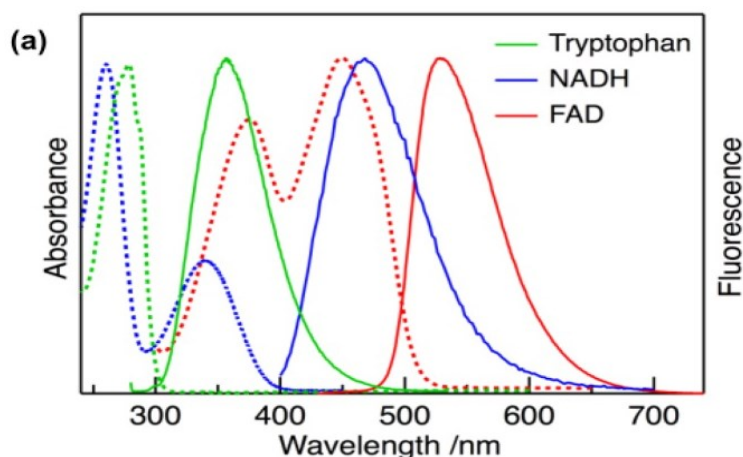
GFP:n eri mutaatioilla on kaikilla fluoroforista riippumatta beetalevyn muodostama suojakuori ympärillään. Suojakuori vakauttaa GFP:n toimintaa ja suojaa fluoroforia ympäristön vaikutuksilta. Mahdollisuus muokata fluoresoiva proteiini reagoimaan haluttuun ympäristöominaisuuteen, toiminnan vakaus ja fluoresenssin kirkkaus tekevät näistä fluoresoivista proteiineista hyviä merkkiaineita solun sisäisiin tutkimuksiin.

4. pH-HERKÄT MERKKIAINEET

Solun sisäisellä pH:lla on suuri merkitys solun toiminnan kannalta. Proteiinien aktiivisuuden kannalta solun pH:n säätely on tärkeää, sillä suurin osa proteiineista vaatii tietyn protoni konsentraation toimiakseen. Solun pH ei ole tasaisesti sama koko solussa vaan pH vaihtelee solussa soluelinten ja muiden toimintojen mukaisesti. Kun solun osan pH muuttuu, aktivoituu alueella jokin tietty prosessi esimerkiksi ATP-synteesi mitokondriossa. Elävien solujen pH:n mittaamista on tutkittu laajalti, koska pH on niin tärkeä solun toiminnan kannalta. Solujen koon ja herkkyyden takia mekaaninen mittaaminen ei onnistu. Fluoresenssi mikroskopia soveltuu pH:n määrittämiseen hyvin, koska se ei vahingoita solua tai häiritse solun normaalia toimintaa. pH:n tarkkaa määrittämistä varten tarvitaan pH-herkkiä merkkiaineita, jotka toimivat hyvin solun sisällä. [16]

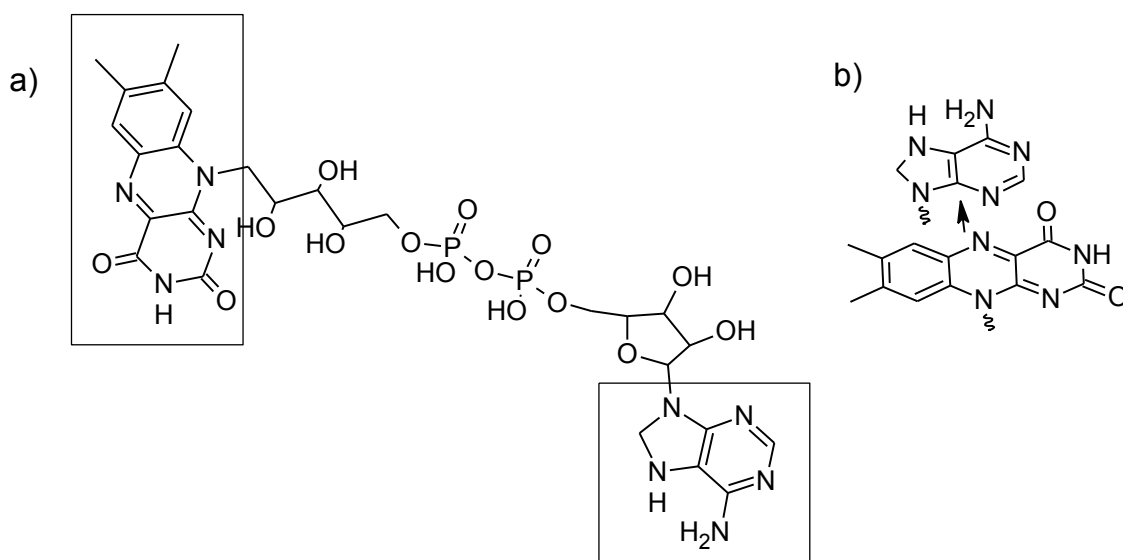
4.1. Solujen autofluoresoivat molekyylit

NADH:n pelkistetyn muodon fluoresenssin elinaika mittauksissa HeLa-soluilla on huomattu, että fluoresenssin elinaika lyheni, kun solun sisäinen pH kasvoi [8]. Tästä päätellen solun pH:ta voidaan mitata ilman erikseen lisättyjä merkkiaineita. NADH:n pelkistetty muoto absorboi voimakkaasti noin 340 nm valoa ja emittoi fluoresenssia sinisen valon alueella. NADH:n emissio ja absorptiospektrit on esitetty kuvassa 8 sinisellä viivalla. FLIM:llä NADH:n virittäminen voidaan tehdä UV-valolla, mutta se voi vahingoittaa eläviä soluja. Jos näkyvän valon lähdettä voitaisiin käyttää virittämiseen, olisi autofluoresenssin elinaika mittaus käyttökelpoinen monen biologisen systeemin tutkimiseen. Joissakin tapauksissa on vaikea arvioida, johtuuko havaittu muutos elinajassa solun sisäisestä pH:sta vai vaikuttaako jokin toinen muutos fluoresenssin elinaikaan. Siksi olisi hyödyllistä, että pH:n muutoksen voisi varmistaa solun omilla kromoforeilla. [8]



Kuva 8 Autofluoressoivien kromoforien absorptio ja emissiospektrit. Absorptiospektrit on merkitty kuvaan katkoviivalla ja emissiot yhtenäisellä viivalla. (Kuva on lähteestä [8]. Käyttölupa on tarkistettu.)

NADH:n tavoin FAD:tä voidaan myös käyttää merkkianeena. Näkyvällä valolla viritetyn FAD:n fluoresenssin elinajan riippuvuutta pH:sta on tutkittu puskuriliuoksessa ja HeLa-soluissa. NADH ja FAD ovat kumpikin tärkeitä kofaktoreita solun energia tasapainon kannalta ja ne esiintyvät soluissa yleensä sitoutuneina proteiineihin. [8] Kumpaakin molekyyliä esiintyy soluissa varsin runsaasti kaikissa solun osissa. Näitä molekyyliä voi siis käyttää hyvin pH muutosten tarkistamiseksi solun sisällä muiden merkkiaineiden rinnalla. FAD esiintyy yleensä osana flavoproteiineja (flavoprotein), jotka ovat heikkoja fluoresoimaan. Flavoproteiinien heikko fluoresointi johtuu siitä, että ympäristön muut proteiinit toimivat tehokkaina sammuttajina flaviini (flavin) kromoforille. Vain osa FAD:n sisältävistä flavoproteiineista, kuten LipDH (lipoamide dehydrogenase), toimivat autofluoresoivina molekyyleinä. FAD molekyylillä on neutraaleissa olosuhteissa kaksi konformaatiota: fluoresoimaton suljettu (stacked) muoto ja fluoresoiva avoin muoto. Pinotussa konformaatiossa alloksaani ja adeniinin aromaattiset renkaat asettuvat päällekkäin, mikä mahdollistaa nopean molekyylin sisäisen elektronin siirron virittyneeltä alloksaani-osalta adeniini-osalle, sammuttaen fluoresenssin pikosekunneissa. Avoinen konformaation fluoresenssin elinaika on 2-3 ns. [8] Konformaatiot on esitetty kuvassa 9. Se kumpaa konformaatiota liuoksessa esiintyy, riippuu FAD:n ympäristön polaarisuudesta. [17]



Kuva 9 FAD:n avoin ja pinottu muoto. Avoimessa muodossa a) molekyyli on tasomainen, joten alloksaani ja adenini osat ovat kaukana toisistaan, eivätkä siksi reagoi molekyylin sisäisesti. Pinotussa muodossa aromaattiset osat asettuvat päällekkäin, jolloin virityksen siirtyminen alloksaanilta adeniinille mahdollistuu. Rakenteessa b on selvyuden vuoksi korvattu aromaattisten ryhmien väliin jäävän hiiliketjun merkitty vain aaltoviivoina. (Kuvat on tehty Chemskechillä.)

Näillä auto fluoresoivilla molekyyileillä ei ole hyvä merkitä jäljitettäviä molekyyliä kuten lääkeaineita, koska autofluoresoivia molekyyliä on soluissa jo luontaisesti. Autofluoresoivien molekyylien avulla voidaan kuitenkin mitata pH niissä kohdissa solua, mihin muilla merkkiaineilla merkitty molekyyli kulkeutuvat. Toisin sanoen autofluoresoivat molekyyli toimivat lähinnä rinnakkaisena määrittämis menetelmänä muille fluoresoiville merkkiaineille. Hyvänä puolena autofluoresoijissa on kuitenkin se, etteivät nämä solun omat molekyyli vahingoita solua itsessään tai häiritse solun toimintaa. Autofluoresoivien molekyylien konsentraatio soluissa riippuu solun tyypistä, toiminta tarkoituksesta ja terveyden tilasta. Eri tyyppisissä soluissa esimerkiksi lihas ja hermosoluissa voivat eri molekyylien konsentraatiot vaihdella solun oman tarpeen mukaisesti.

4.2. Solun sisäisiin pH-muutoksiin sopivia merkkiaineita

Vety-ionit ovat tärkeässä roolissa elävissä soluissa. Vety-ioni konsentraation muutos vaikuttaa suoraan proteiinien sivuhaarojen varauksiin. Molekyylien negatiivinen tai positiivinen varaus sen sijaan vaikuttaa entsyymien aktiivisuuteen ja laskostumiseen sekä sijaintiin solussa. Lisäksi ATP-syntaasin, joka tuottaa ATP:tä solun monien prosessien energian välittäjäksi, toiminta perustuu vety-ionien siirtymiseen kalvojen läpi mitokondriossa. Eri soluelinten pH-tasot siis vaikuttavat suuresti solun toimintaan. Solun toiminta itsessään vaikuttaa solun pH:n tasoon. Se onko solu esimerkiksi lihaksesta, jolloin solu on erikoistunut liikkeen tuottamiseen, ruuansulatuselimistöstä tai hermostosta aiheuttaa suuria eroja solun toimintaan ja sitä kautta myös pH:hon.

Escherichia coli (*E. coli*) eli kolibakteeri solussa sytoplasman pH vaihtelee välillä 7,2-7,8. pH arvot johtuvat solun passiivisista ja aktiivista mekanismeista, joita solu tarvitsee selviytyäkseen ihmisen ruuansulatuselimistössä, missä ympäristön pH voi vaihdella 4,5:n ja 9:n välillä. Yksi passiivinen mekanismi sopivan solunsisäisen pH:n ylläpitämiseksi on solun puskuriominaisuus. Puskuriominaisuus määritellään sen mukaan, miten paljon täysin dissosioituvaa happoa on lisättävä puskuriliuokseen, että solun pH laskisi yhdellä yksiköllä. Solun sisäisen puskuriominaisuuden tyypillinen arvo on 10-100 mM pH yksikön muutosta kohti. Aktiivisia puskurointimekanismeja on esimerkiksi hiiva solun ylimääräisten protonien pumppaaminen vakuoliin solulimasta. Protonien siirtäminen vakuoliin on tapa pitää sytoplasman pH lähellä arvoa 7, vaikka vakuolin pH happamoituu noin 5,5-6,5. Fluoresenssi mittauksilla on todettu, että hiivasolun mitokondrion pH pysyy 7,5:ssä, kun solun pH on ollut välillä 5,5-6,5. Eri kokeissa on mitattu hiivasolun sisäisten pH-arvojen pysyvän varsin vakaina, kun ympäristön pH:ta on muutettu. Toisissa kokeissa on tosin käynyt myös niin, että solun sisäinen pH on ollut lähellä ympäristön pH:ta. pH-herkkiä merkkiaineita käyttäen on tutkittu lisäksi HeLa soluja. Solujen tuman pH oli noin 7,3, mitokondrion noin 8,0, solulimakalvostossa noin 7,5 ja Golgin laitteessa noin 6,6. Eläin kudosten, aivoista lihaksiin ja sydämeen, solujen sisäinen pH vaihtelee pääasiassa 6,5 ja 7,5:n välillä. Mitokondrioiden pH:t ovat pysyneet muita elimiä vakaampana noin 7,9-8,2 välillä tutkimuksissa, joissa soluelinten pH:hon on yritetty vaikuttaa ympäristömuutoksilla. Mitokondriot ovat suhteellisen suljettu systeemi solun sisällä ja niiden toiminta perustuukin suurilta osin vetyionien kuljetukseen soluhengityksessä vedynsiirtoketjussa. [18][19]

Solun sisäinen pH siis vaihtelee lysosomin happamasta 4,5:stä, golginlaitteen ja soluliman lähes neutraalin 6,6 – 7,5:n kautta mitokondrion lievästi emäksiseen jopa 8,2:n pH:een. Sisäisiin pH-arvoihin vaikuttaa solujen alkuperä ja solun pääasiallinen toiminta. Ympäristön vaikutus solun sisäisiin pH-arvoihin voi vaihdella mutta pääasiallisesti solun pH pysyy vakaana ulkoisista muutoksista huolimatta. Työn tarkoituksena on siis selvittää mahdollisia pH-herkkiä merkkiaineita, jotka soveltuvat fluoresenssin elinaika mittauksiin pH-alueella 4,5 – 8,5.

Seuraavaksi esitellään tutkimuksia, joissa on selvitetty eräiden merkkiaineiden soveltuvuutta pH:n määrittämiseen FLIM:n avulla. Nämä merkkiaineet voisivat soveltua myös TTY:n laitteistolle.

Hille *et al.* tutkivat neljän kaupallisen pH-herkän fluoresoivan merkkianeen sopivuutta solun sisäiselle pH alueelle. Tutkittavia merkkianeita olivat: 2',7'-bis(2-karboksietyyli)-5-(ja -6)-karboksifluoresiinin asetoksimetyyliesteri (BCECF-AM), 5-(ja -6)-karboksyylihapon asetoksimetyyliesteri (SNARF-5F), 1,4-dibromipentaani (LysoSensor Green DND-153) ja 8-hydroksipyreeni-1,3,6-trisulfonihapon trinitriumsuolo (HPTS). Solut olivat uros *americana* torakan sylkirauhasista ja solut preparoitiin erikseen kokeita varten. Solujen sisäistä pH:ta säädetiin ulkoisen pH:n avulla, mikä onnistui solujen high-K⁺/nigericin käsittelyn ansiosta. Menetelmä tasapainottaa protoni pitoisuuden solukalvon molemmiin puolin. Normaalisti solut vastustaisivat sisäistä pH muutosta esimerkiksi protonipumppujen avulla. Rinnalla tehtiin myös mittaukset torakan fysiologisessa suolaliuoksessa. pH:ta säädettiin HCl:llä ja NaOH:lla. Tutkimuksessa selvisi, että BCECF-merkkiaine soveltui tutkituista merkkiaineista parhaiten solun sisäisen *in vitro* pH:n määrittämiseen eli pH:n alueella 5,5-8,5. Emäksisen alueen pH muutokset havaittiin paremmin kuin happamat. [6]

pH-herkkä merkkiaine C-SNARF-4 on luotettava pH indikaattori pH:sta 5.5 ylöspäin. Happamampien pH-arvojen mittaaminen ei onnistu tällä merkkiaineella. Emissio spektri ei riipu viritysaallonpituudesta välillä 480 – 530. [20] Vastaavaa C-SNARF-4 merkkiainetta käytettiin myös Hunter *et al.* tutkimuksissa [21], missä viritysaallonpituus oli 488 nm ja emissio havaittiin 580 nm:n ja 640 nm:n aallonpituuksilla. Mitatut pH:t vaihtelivat 5,6:n ja 7,6:n välillä.

Nakabayashi *et al.*:n tutkimusryhmä tutki EYFP:n soveltuvuutta pH:n mittaamiseen FLIM:llä liuoksessa ja soluissa. Solunäytteinä he käyttivät HeLa soluja, joiden sisäinen pH kalibroitiin high K⁺/nigericin menetelmällä kuten Hille *et al.* [6] tutkimuksessaan. EYFP:n elinaikamuutoksia tutkittiin ensin puskuri liuoksissa käyttäen viritysaallonpituuksina 400 nm, 440 nm ja 470 nm. Emissio mitattiin 535 ± 5 nm kohdalla. Liuos mittausten tuloksista tulkittiin, että EYFP soveltuu pH:n 4,5-6 määrittämiseen käytettäessä 440 nm viritys aallonpituutta. Emäksisemmässä pH:ssa fluoresenssin elinaika muutos pienenee pH:n kasvaessa. EYFP:tä voi kuitenkin käyttää solun koko pH:n muutos alueella mutta neutraalin läheisyydessä mitattu tarkkuus pienenee. EYFP sopii siis erityisesti lysosomien ja synapsien vesikkelien pH:n määrittämiseen. Kun EYFP:tä viritettiin 400 nm aallonpituudella, oli fluoresenssin elinajan ja pH:n riippuvuuden tulkinta vaikeaa, johtuen fluoresenssin heikosta intensiteetistä. [17]

EGFP:llä on myös tutkittu HeLa-solujen pH-muutoksilla [14]. EGFP-näytettä viritettiin 405 nm aallonpituudella ja emissio mitattiin 510 ± 5 nm kohdalta. Fluoroforin neutraalin ja anionisen muodon emissio spektrit havaittiin kummatkin noin 510 nm kohdalla. Fluoresenssin elinaika laski, kun HeLa-solun sisäinen pH laski. Näiden kokeiden perusteella EGFP:n fluoresenssin elinajan muutoksen avulla voi mitatta HeLa-

solun sisäistä pH:ta. EGFP:tä voi siis käyttää pH-herkkänä merkkiaineena HeLa-soluissa pH:lle 4,5-7,5.

Solun sisäisiin mittauksiin on myös kokeiltu tehdä nanopartikkeleita, joissa ulkokuori on valmistettu SiO_2 eli piidioksidin nanorakenteista ja fluoresenssia varten on käytetty kahta merkkiainetta. Tarkoitus on siis valmistaa GFP:n tavoin suojakuorella varustettu fluoresoiva merkkiaine. Piidioksidin suosio kuoren materiaalina johtuu siitä, että piidioksidin reaktiot tunnetaan jo hyvin, joten kuoren muokkaaminen halutun laiseksi on varsin helppoa. Tärkeää on myös se, että piioksidin nanorakenteet eivät ole myrkyllisiä ja ne ovat kemiallisesti inerttejä sekä optisesti läpinäkyviä. SiO_2 -nanopartikkelit sopisivat siis hyvin solujen tutkimiseen, koska nanopartikkelien kuori ei reagoisi ympäristön kanssa. Ainoastaan kuoreen liitetyt reseptori molekyylit reagoisivat ympäristön muutoksiin. Optisesti läpinäkyvä kuori ei myöskään häiritse fluoresenssin mittaamista. Toiminnallisuus nanopartikkelille tehdään lisäämällä rakenteeseen esimesimerkiksi kahta eri fluoresoivaa merkkiainetta [10]. Nanopartikkelin pinnalla käytetään yhtä pH-herkkää merkkiainetta mittaamaan ulkoista pH-muutosta ja ytimeen lisätty eristetty pH-herkkä merkkiaine toimii referenssinä. pH määritetään lopulta mittaavan kuori merkkiaineen fluoresenssin ja referenssi merkkiaineen fluoresenssin intensiteetin suhteesta. Referenssi merkkiaineen spektri pysyy vakiona, kun viritysaallonpituutta ei muuteta. [10]

Banerjee *et al.* sovelsi nanopartikkelissaan anisotrooppista piioksidin nanorakennelevyä (anisotropic silica nanodisks) ja merkkiaine pareina heillä oli rodamiini B isotiosyanaatti (RITC) / fluoresiini isotiosyanaatti (FITC) ja RITC /protoporfyriini IX (PP). RITC oli kummassakin parissa ytimen referenssi merkkiaine. FITC ja PP ovat toiminnaltaan hyvin samankaltaiset. Kumpikin toimii yleisesti pH-herkkänä merkkiaineena fluoresenssi mittauksissa. PP vaikuttaisi olevan parempi kuin FITC, koska FITC:n elinajan muutos pH:lla 4,4-8,0 on pienempi kuin PP:llä. PP:tä voi käyttää myös happamissa olosuhteissa $pH < 4,4$. Kumpaakin näistä kuoren merkkiaineista (FITC ja PP) voisi käyttää myös itsenäisenä pH:herkkänä merkkiaineena. Tulosten mukaan referenssi merkkiaineen avulla mitattavissa oleva pH väli voidaan kuitenkin laajentaa kummallakin merkkiaineella. [10]

Banerjee *et al.* tutkimuksen lopputuloksena oli se, että ytimen suojattu referenssi merkkiaine laajentaa kuoren pH-herkän merkkiaineen havaitsemaa pH:ta ja kasvattaa elinajan maksimin ja minimi erotusta. Viritysaallonpituutena kummallakin nanopartikkelilla käytettiin 480 nm ja fluoresenssin emissiot oli normalisoitu 580 nm kohdalla. [10]

5. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

FLIM on varmempi menetelmä määrittää solun sisäinen pH kuin fluoresenssin intensiteettiin perustuvat menetelmät. Monet fluoresenssin intensiteettiin vaikuttavista tekijöistä, kuten esimerkiksi merkkiaineen tasainen jakautuminen näytteessä, eivät vaikuta FLIM mittaukseen. pH-herkkiä fluoresoivia merkkiaineita tunnetaan useita mutta suurin osa niistä soveltuu vain intensiteettiin perustuviin mittauksiin. FLIM menetelmälle soveltuvia merkkiaineita, jotka soveltuisivat solun sisäiselle pH:lle ei toistaiseksi ole kovin monia. Työn tavoitteena oli kuitenkin löytää solun sisäiselle pH:lle soveltuvia merkkiaineita, joiden virittäminen onnistuisi 375 nm, 405 nm, 483 nm tai 658 nm aallonpituudella.

Työssä käytiin läpi fluoresenssin perus teoria, fluoresenssin elinaika, fluoresoivien merkkiaineiden rakenteita ja lopuksi solun sisäisen pH:n mittaamiseen soveltuvia FLIM merkkiaineita. Työn aikana löytyneistä merkkiaineista tavoitteisiin sopivat C-SNARF-4, BCECF ja GFP:n variaatiot EGFP sekä EYFP.

C-SNARF-4 soveltui pH:lle 5,5-7,6 mutta se ei sovellu happamiin soluihin, joissa pH voi laskea lähes 4:än. BCECF soveltuu vastaavalle pH alueelle noin 5,5:stä 8,5:en eli BCECF soveltuu myös mitokondrioihin. EYFP sen sijaan soveltui paremmin happamiin soluihin, joissa pH on 4,5-6. EGFP toimii happamasta pH:sta 4,5 lähes neutraaliin 7,5:n pH:en. Näistä merkkiaineista yksikään ei sovellu solun koko mahdolliselle pH-skaalalle mutta tutkimuskohteesta riippuen näistä pitäisi löytyä sopiva merkkiaine solun kaikkiin osiin.

Edellä mainittujen merkkiaineiden lisäksi solun sisäisen pH:n mittaamiseen FLIM:llä voisi käyttää myös solujen autofluoresointia. FAD:n absorptiospektri (kuva 7) vaikuttaisi osuvan halutuille aallonpituuksille 405 nm ja 483 nm. Näitä molekyyliä ei kuitenkaan voi käyttää esimerkiksi lääkeaineen leimaamiseen, koska solut sisältävät jo itse kyseisiä molekyyliä, joten lääkeaineen paikantaminen olisi lähes mahdotonta. Autofluoresoivia molekyyliä voisi kuitenkin käyttää, jonkin ei pH-herkän merkkiaineen rinnalla pH:n määrittämiseen.

Lisäksi on myös nanopartikkeleita, jotka työn teko hetkellä ovat vielä haitallisia soluille ja eliöille. Kun nanopartikkeleihin löydetään sopivat soluille myrkyttömät puolijohdeytimet tai pinnoitteet, jotka eristävät myrkylliset aineet, olisivat nanopartikkelit hyvä vaihtoehto solun sisäisten muutosten tutkimiselle, nanopartikkelien muokattavuus on varsin suuri.

Työssä ei löytynyt kovin monia soveltuvia pH-herkkiä fluoresoivia merkkiaineita FLIM:ä varten. Kaikkia lähteitä ei ollut saatavilla työtä varten, joten näissä lähteissä esiintyviä merkkiaineita saattoi jäädä huomioimatta. GFP:n johdannaisista löytyisi

varmasti vielä lisää solun sisäisiin mittauksiin soveltuvia merkkianeita ja eri aallonpituuksilla virittyviä toimivia fluoroforeja on jo ainakin kahdeksan. Jokainen GFP:n väri variaatio absorboi ja emittoi eri aallonpituuksilla. Näiden proteiinien ominaisuuksiakin on suhteellisen helppo muokata pistemutaatioiden avulla, joten niistä tullaan varmasti löytämään sopivat merkkiaineet moneen tarkoitukseen.

Yhteenvedona voisi todeta, että fluoresoivia merkkiaineita on moniin eri tarkoituksiin sopivia ja niitä kehitellään jatkuvasti lisää. Tämän työn tavoitteeseen parhaiten sopivat C-SNARF-4, BCECF, EYFP ja EGFP. Mikään näistä merkkiaineista ei kuitenkaan kata koko solun sisäistä pH:n vaihteluväliä mutta yhdistelemällä merkkiaineiden käyttöä sopivasti koko skaala on mitattavissa. Näiden neljän lisäksi myös fluoresiini FITC ja protoporfiriini PP, jotka mainittiin nanopartikkelin yhteydessä, voivat toimia pH-herkkinä merkkiaineina solun sisällä. Nämä merkkiaineet jäivät itsenäisinä merkkiaineina vähemmälle huomiolle, koska niistä ei löytynyt tutkimusta, jossa niitä olisi sovellettu solussa.

LÄHTEET

- [1] P. Atkins, J. de Paula, Atkins'Physical Chemistry, Oxford University Press, 8th edition, printed in Italy, 2006, pp. 492–494, 845–852.
- [2] K. Kalliorinne, A. Kankaanperä, A. Kivinen, S. Liukkonen, Fysikaalinen kemia 3, 20.1 Valokemialliset prosessit, s. 166–169, Kirjayhtymä Helsinki, Painatus: Oy Länsi-Suomi, Rauma 1990
- [3] I. Johnson, M.T.Z. Spence, Molecular probes handbook, a guide to fluorescent probes and labeling technologies, Life Technologies, 11th edition, 2010, pp. 1–8.
- [4] H. Szmecinski, J.R. Lakowicz, Fluorescence lifetime-based sensing and imaging, Sensors and Actuators B 29 (1995), pp. 16–24.
- [5] K. Suhling, L.M. Hirvonen, J.A. Levitt, P.-H. Chung, C. Tregidgo, A.L. Marois, D.A. Rusakov, K. Zheng, S. Ameer-Berg, S. Poland, S. Coelho, R. Henderson, N. Krstajic, Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments, Medical Photonics, volume 27, May 2015, pp. 3–40.
- [6] C. Hille, M. Berg, L. Bressel, D. Munzke, P. Primus, H.-G. Löhmannsröben, C. Dosche, Time-domain fluorescence lifetime imaging for intracellular pH sensing in living tissue, Analytical and Bioanalytical Chemistry, July 2008, 391:1872–1879.
- [7] M. von Knebel Doeberitz, N. Wentzen, The Cell: Basic Structure and Function, in Comprehensive Cytopathology, 3rd edition, 2008.
- [8] S. Islam, M. Honma, T. Nakabayashi, M. Kinjo, N. Ohta, pH Dependence of the Fluorescence Lifetime of FAD in Solution and in Cells, International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14, pp. 1952–1963.
- [9] M.A. Walling, J.A. Novak, J.R.E. Shepard, Quantum Dots for Live Cell and In Vivo Imaging, International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10, pp. 441–491.
- [10] S. Banerjee, A. Dhir, T. Banerjee, A.K. Singh, A. Datta, Silica nanodisks as platforms for fluorescence lifetime-based sensing of pH, Journal of Chemical Science, Volume 123, Issue 6, November 2011, pp. 901–907.

- [11] F.-J. Schmitt, B. Thaa, C. Junghans, M. Vitali, M. Veit, T. Friedrich, eGFP-pHsens as a Highly sensitive fluorophore for cellular pH determination by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM), *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, Volume 1837, issue 9, September 2014, pp. 1581–1593.
- [12] A. Kobayashi, J.S. Duffield, Use of genetic mouse models to study kidney regeneration, *Regenerative Nephrology*, 2011, chapter 3, pp. 37-66, viitattu 19.6.2018: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/green-fluorescent-protein>.
- [13] T. Nakabayashi, H.-P. Wang, M. Kinja, N. Ohta, Application of fluorescence lifetime imaging of enhanced green fluorescent protein to intracellular pH measurement, *Photochemical Photobiological Sciences*, Issue 6, 2008, (viitattu 19.6.2018): <http://pubs.rsc.org.libproxy.tut.fi/en/Content/ArticleLanding/2008/PP/b800391b#!divAbstract>.
- [14] D.W. Piston, N.S. Claxton, S.G. Olenych, M.W. Davidson, The Fluorescent Protein Color Palette, Olympus Scientific Solutions Americas Corp, viitattu 20.6.2018: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/applications/fpcolorpalette/>.
- [15] A. Nolles, A.H. Westphal, J.M. Kleijn, W.J.H. van Berkel, J. W. Borst, Colorful Packages: Encapsulation of Fluorescent Proteins in Complex Coacervate Core Micelles, *International Journal of Molecular Sciences*.
- [16] T. Nakabayashi, S. Oshita, R. Sumkawa, F. Sun, M. Kinjo, N. Ohta, pH dependence of fluorescence lifetime of enhanced yellow fluorescent protein in solution and cells, *Journal of Photochemistry and Physiology A: Chemistry* 235 (2012), pp. 65–71.
- [17] T. Nakabayashi, S. Islam, N. Ohta, Fluorescence Decay Dynamics of Flavin Adenine Dinucleotide in a Mixture of Alcohol and Water in Femtosecond and Nanosecond Time Range, *The journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114(46), pp. 15254–15260.
- [18] J. Llopis, J.M. McCaffery, A. Miyawaki, M.G. Farquhar, R.Y. Tsien, Measurements of cytosolic, mitochondrial and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 95(12): 6803–6808. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC22642/>.
- [19] R. Milo, R. Phillips, *Cell biology by the numbers* draft (July 2015), Garland Science, pp. 122–126.

- [20] Z. Burdikova, Z. Svindrych, J. Pala, C.D. Hickey, M.G. Wilkinson, J. Panek, M.A.E. Auty, A. Periasamy, J.J. Seehan, Measurement of pH micro-heterogeneity in natural cheese matrices by fluorescence lifetime imaging, *Frontiers in Microbiology*, Volume 6, Issue MAR, 2015, Article number 183.
- [21] R.C. Hunter, T.J. Beveridge, Application of a pH-sensitive fluorophore (C-SNARF-4) for pH microenvironment analysis in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, volume 71, issue 5, May 2005, pp. 2501–2510.
- [22] Z. Ahmed, C.C. Lin, K.M. Suen, F.A. Melo, J.A. Levitt, K. Suhling, J.E. Ladbury, Grb2 controls phosphorylation of FGFR2 by inhibiting receptor kinase and Shp2 phosphatase activity *J. Cell Biol.* 200, 2013, pp.493–504.
- [23] R.R. Duncan, Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to quantify protein-protein interactions inside cells, *Biochem. Soc. Trans.* 34, 2006, pp.679–682.
- [24] F. Festy, S.M. Ameer-Beg, T. Ng, K. Suhling, Imaging proteins in vivo using fluorescence lifetime microscopy, *Mol. Biosyst.* 3, 2007, pp. 381–391.
- [25] E.A. Jares-Erijman, T.M. Jovin, FRET imaging, *Nat. Biotechnol.* 21, 2003, pp. 1387–1396.
- [26] A.L. Mattheyses, A.D. Hoppe, D. Axelrod, Polarized fluorescence resonance energy transfer microscopy, *Biophys. J.* 87, 2004, pp 2787–2797.
- [27] M. Peter, S.M. Ameer-Beg, Imaging molecular interactions by multiphoton FLIM, *Biol. Cell* 96, 2004, pp. 231–236.
- [28] A. Pietraszewska-Bogiel, T.W.J. Gadella, FRET microscopy: From principle to routine technology in cell biology, *J. Microsc.* 241, 2011, 111–118.
- [29] K. Shuling, P.M.W. French, D. Philips, Time-resolved fluorescence microscopy, *Photochem. Photobiol. Sci.* 4, 2005, pp. 13–22.
- [30] A.N. Bader, E.G. Hofman, P.M.P. van Bergen en Henegouwen, H.C. Gerritsen, imaging of protein cluster sizes by means of confocal time-gated fluorescence anisotropy microscopy, *Opt Express* 15, 2007, 6934–6945.
- [31] A.N. Bader, E.G. Hofman, J. Voortman, P.M.P. van Bergen en Henegouwen, H.C. Gerritsen, Homo-FRET imaging enables quantification of protein cluster sizes with subcellular resolution, *Biophys. J.* 97, 2009, pp.2613–2622.

- [32] M.J. Roberti, T.M. Jovin, E. Jares-Erijman Confocal fluorescence anisotropy and FRAP imaging of alpha-synuclein amyloid aggregates in living cells, *PLoS ONE* 6, 2011, e23338.
- [33] C. Thaler, S.V. Kaushik, H.L. Phul, P.S. Blank, S.S. Vogel Structural rearrangement of CaMKII alpha catalytic domains encodes activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106, 2009, pp. 6369–6374.
- [34] R. Varma, S. Mayor, GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface, *Nature* 394, 198, pp. 798–801.
- [35] H.D. Vishwasrao, P. Trifilieff, E.R. Kandel, In vivo imaging of the action polymerization state with two-photon fluorescence anisotropy, *Biophys. J.* 102, 2012, pp. 1204–1214.
- [36] E.K.L. Yeow, A.H.A. Clayton, enumeration of oligomerization states of membrane proteins in living cells by homo-FRET spectroscopy and microscopy: theory and application. *Biophys. J.* 92, 2007, 3098–3104.
- [37] S.W. Botchway, A.M. Lewis, C.D. Stubbs, Development of fluorophore dynamics imaging as a probe for lipid domains in model vesicles and cell membranes, *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* 40, 2011, pp. 131–141.
- [38] A.H.A Clayton, Q.S. Hanley, D.J. Arndt-Jovin, V. Subramaniam, T.M. Jovin, Dynamic fluorescence anisotropy imaging microscopy in the frequency domain (rFLIM), *Biophys. J.* 83, 2002, pp. 1631–1649.
- [39] K. Shuling, J. Spiegel, P.M.P. Lanigan, S. L  v  que-Fort, S.E.D. Webb, D. Phillips, D.M. Davis, P.M.W. French, Time-resolved fluorescence anisotropy imaging applied to live cells, *Opt. Lett.* 29, 2004, pp. 584–586.
- [40] A. Battisti, S. Panettieri, G. Abbandonato, E. Jacchetti, F. Cardarelli, G. Signore, F. Beltram, R. Bizzarri, Imaging intracellular viscosity by a new molecular rotor suitable for phasor analysis of fluorescence lifetime, *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 2013, pp. 6223–6233.
- [41] K.P. Ghiggino, J.A. Hutchison, S.J. Langford, M.J. Latter, M.A.P. Lee, Porphyrin-based molecular rotors as fluorescent probes of nanoscale environments, *Adv. Funct. Mater.* 17, 2007, pp. 805–813.
- [42] M.A. Haidekker, A.G. Tsai, T. Brady, H.Y. Stevens, J.A. Frangos, E. Theodorakis, M. Intaglietta, A novel approach to blood plasma viscosity measurement using fluorescent molecular rotors, *Am. J. Physiol: Heart Circ. Physiol.* 282, 2002, pp. H160–H1614.

- [43] M. Haidekker, T.P. Brady, D. Lichlyter, E.A. Theodorakis, a ratiometric fluorescent viscosity sensor, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 2006, pp. 398–399.
- [44] N.A. Hosny, G. Mohamedi, P. Rademeyer, J. Owen, Y. Wu, M.X. Tang, R.J. Eckersley, E. Stride, M.K. Kuimova, mapping microbubble viscosity using fluorescence lifetime imaging of molecular rotors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 2013, pp. 9225–9230.
- [45] G. Hungerford, A. Allison, D. McLoskey, M.K. Kuimova, G. Yahiloglu, K. Shuling, Monitoring sol-to-gel transitions via fluorescence lifetime determination using viscosity sensitive fluorescent probes, *J. Phys. Chem. B* 113, 2009, pp. 12067–12074.
- [46] M.K. Kuimova, G. Yahiloglu, J.A. Levitt, K. Shuling Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescent lifetime imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 130, 2008, pp. 6672–6673.
- [47] M.K. Kuimova, S.W. Botchway, A.W. Parker, M. Balaz, H.A. Collins, H.L. Anderson, K. Shuling, P.R. Ogilby, Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death, *Nat. Chem.* 1, 2009, pp. 69–73.
- [48] J.A. Levitt, M.K. Kuimova, G. Yahiloglu, P.H. Chung, K. Shuling, D. Phillips, Membrane-bound molecular rotors measure viscosity in live cells via fluorescent lifetime imaging, *J. Phys. Chem. C* 113, 2009, pp. 11634–11642.
- [49] J.A. Levitt, D.R. Matthews, S.M. Ameer-beg, K. Shuling, Fluorescence lifetime and polarization-resolved imaging in cell biology, *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 2009, pp. 28–36.
- [50] P. Loison, N.A. Hosny, P. Gervais, D. Champion, M.K. Kuimova, J.M. Perrier-Cornet, Direct investigation of viscosity of an atypical inner membrane of *Bacillus* spores: a molecular rotor/FLIM study. *Biochem. Biophys. Acta* 1828, 2013, pp. 2436–2443.
- [51] M.E. Nipper, S. Majd, M. Mayer, J.C. Lee, E.A. Theodorakis, M.A. Haidekker, Characterization of changes in the viscosity of lipid membranes with the molecular rotor FCVJ. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 208, pp. 1148–1153.
- [52] M.E. Nipper, M. Dakanali, E.A. Theodorakis, M.A. Haidekker, Detection of liposome membrane viscosity perturbations with ratiometric molecular rotors. *Biochimie* 3, 2010, pp. 988–994.

- [53] X. Peng, Z. Yang, J. Wang, J. Fan, Y. He, F. Song, B. Wang, S. Sun, J. Qu, J. Qi, M. Yan, Fluorescence ratiometry and fluorescence lifetime imaging: using a single molecular sensor for dual mode imaging of cellular viscosity, *J. Am. Chem. Soc.* 133, 2011, pp. 6626–6635.
- [54] C. Rumble, K. Rich, G. He, M. Maroncelli, CCVJ is not a simple rotor probe, *J. Phys. Chem. A* 116 2012, pp. 10786–10792.
- [55] B. Wandelt, A. Mielniczak, P. Turkewitsch, G.D. Darling, B.R. Stranix, Substitued 4-[4-(dimethylaminostyryl)pyridinium salt as a fluorescent probe for cell microviscosity. *Biosens. Bioelectron.* 18, 2003, pp. 465–471.
- [56] L.-L. Zhu, D.-H. Qu, D. Zhang, Z.-F. Chen, Q.-C. Wang, H. Tian, Dual-mode tunable viscosity sensitivity of a rotor-based fluorescent dye, *Tetrahedron* 66, 2010, pp. 1254–1260.
- [57] O. Golfetto, E. Hinde, E. Gratton, LAurdan fluorescence lifetime discriminates cholesterol content from changes in fluidity in living cell membranes, *Biophys. J.* 104, 2013, pp. 1238–1247.
- [58] D.M. Owen, P.M.P. Lanigan, C. Dunsby, I. Munro, D. Grant, M.A.A. Neil, P.M.W. French, A.I. Magee, Fluorescence lifetime imaging provides enhanced contrast when imaging the phasesensitive dye di-4-ANEPPDHQ in model membranes and live cells, *Biophys. J.* 90, 2006, L80–L82.
- [59] D.M. Owen, C. Rentero, A. Magenau, A. Abu-Sintyeh, K. Gaus, Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms, *Nat. Protoc.* 7, 2012, pp. 24–35.
- [60] M.A. Bennet, P.R. Richardson, J. Arlt, A. McCarthy, G.S. Buller, A.C. Jones, Optically trapped microsensors for microfluidic temperature measurement by fluorescence lifetime imaging microscopy, *Lab Chip* 11, 2011, 3821–3828.
- [61] R.K.P. Benninger, O. Hofmann, J. McGinty, J. Requejo-Isidro, I. Munro, M.A.A. Neil, A.J. deMello, P.M.W. French, Time-resolved fluorescence imaging of solvent interactions in microfluidic devices. *Opt. Express* 13, 2006, pp. 6275–6285.
- [62] E.M. Graham, K. Iwai, S. Uchiyama, A.P. de Silva, S.W. Magennis, A.C. Jones, Quantitative mapping of aqueous microfluidic temperature with sub-degree resolution using fluorescence lifetime imaging microscopy. *Lab Chip* 10, 2010, pp. 1267–1273.

- [63] D.A. Mendels, E.M. Graham, S.W. Magennis, A.C. Jones, F. Mendels, Quantitative comparison of thermal and solutal transport in a T-mixer by FLIM and CFD, *Microfluid. Nanofluid.* 5, 2008, pp. 603–617.
- [64] K. Okabe, N. Inada, C. Gota, Y. Harada, T. Funatsu, S. Uchiyama, Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy, *Nat. Commun.* 3, 2012, p. 705.
- [65] J.W. Borst, M.A. Hink, A. Hoek, A.J.W.G. Visser, Effects of refractive index and viscosity on fluorescence and anisotropy decays of enhanced cyan and yellow fluorescent proteins, *J. Fluoresc.* 15, 2005, pp. 153–160.
- [66] Y.J. Ma, P. Rajendran, C. Blum, Y. Cesa, N. Gartmann, D. Buhwiler, V. Subramaniam, Microspectroscopic analysis of green fluorescent proteins infiltrated into mesoporous silica nanochannels, *J. Colloid Interface Sci.* 356, 2011, pp. 123–130.
- [67] A. Pliss, L.L. Ohulchanskyy, J.L. Qu, P.N. Prasad, Fluorescence lifetime of fluorescent proteins as an intracellular environment probe sensing the cell cycle progression, *ACS Chem. Biol.* 7, 2012, pp. 1385–1392.
- [68] K. Suhling, J. Siegel, D. Phillips, P.M.W. French, S. L  v  que-Fort, S.E.D. Webb, D.M. Davis, Imaging the environment of green fluorescent protein, *Biophys. J.* 83, 2002, pp. 3589–3595.
- [69] J. Tisler, G. Balasubramanian, B. Naydenov, R. Kolesov, B. Grotz, R. Reuter, J.P. Budou, P.A. Curmi, M. Sennour, A. Thorel, M. B  rsch, K. Aulenbacher, R. Erdmann, P.R. Hemmer, F. Jelezko, J. Wrachtrup, Fluorescence and spin properties of defects in single digit nanodiamonds. *ACS Nano* 3, 2009, pp. 1959–1965.
- [70] C. Tregidgo, J.A. Levitt, K. Shuling, Effect of refractive index on fluorescence lifetime of green fluorescent protein, *J. Biomed. Opt.* 13, 2008, 031218.
- [71] H.J. van Manen, P. Verkuijlen, P. Wittendorp, V. Subramaniam, T.K. van den Berg, D. Roos, C. Otto, Refractive index sensing of green fluorescent proteins in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy, *Biophys. J.* 94, 2008, pp. L67–L69.
- [72] S.F. Wuister, C. de Mello Donega, A. Meijerink, Local-field effects on the spontaneous emission rate of CdTe and CdSe quantum dots in dielectric media, *J. Chem. Phys.* 121, 2004, pp. 4310–4315.

- [73] M.J. Behne, J.W. Meyer, K.M. Hanson, N.P. Barry, S. Murata, D. Crumrine, R.W. Clegg, E. Gratton, W.M. Holleran, P.M. Elias, NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis. Microenvironment acidification assessed with fluorescence lifetime imaging, *J. Biol. Chem.* 277, 2002, pp. 47399–47406.
- [74] K. Carlsson, A. Liljeborg, R.M. Andersson, H. Brismar, Con-focal pH imaging of microscopic specimens using fluorescence lifetimes and phase fluorometry: influence of parameter choice on system performance, *J. Microsc.* 199, 2000, pp. 106–114.
- [75] K.M. Hanson, M.J. Behne, N.P. Barry, T.M. Mauro, E. Gratton, R.M. Clegg, Two-photon fluorescence lifetime imaging of the skin stratum corneum pH gradient, *Biophys. J.* 83, 2002, pp. 1682–1690.
- [76] C. Hille, M. Berg, L. Bressel, D. Munzke, P. Primus, H.G. Löhmannsröben, C. Dosche, Time-domain fluorescence lifetime imaging for intracellular pH sensing in living tissues, *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 2008, pp. 1871–1879.
- [77] H.J. Lin, P. Herman, J.R. Lakowicz, Fluorescence lifetime-resolved pH imaging of living cells, *Cytometry* 52A, 2003, pp. 77–89.
- [78] B.R. Masters, P.T.C. So, E. Gratton, Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin, *Biophys. J.* 72, 1997, pp. 2405–2412.
- [79] S. Ogikubo, T. Nakabayashi, T. Adachi, M.S. Islam, T. Yoshizawa, M. Kinjo, N. Ohta, Intracellular pH sensing using autofluorescence lifetime microscopy, *J. Phys. Chem. B* 115, 2011, pp. 10385–10390.
- [80] R. Sanders, A. Draaijer, H.C. Gerritsen, P.M. Houpt, Y.K. Levine, Quantitative pH imaging in cells using confocal fluorescence lifetime imaging microscopy, *Anal. Biochem.* 227, 1995, pp. 302–308.
- [81] H.C. Gerritsen, R. Sanders, A. Draaijer, C. Ince, Y.K. Levine, Fluorescence lifetime imaging of oxygen in living cells, *J. Fluoresc.* 7, 1997, pp. 11–16.
- [82] N.A. Hosny, D.A. Lee, M.M. Knight, Single photon counting fluorescence lifetime detection of pericellular oxygen concentrations, *J. Biomed. Opt.* 17, 2012, 016007.
- [83] S.S. Howard, A. Straub, N.G. Horton, D. Kobat, C. Xu, Frequency-multiplexed in vivo multiphoton phosphorescence lifetime microscopy, *Nat. Photonics* 7, 2013, pp. 33–37.

- [84] X.-D. Wang, O.S. Wolfbeis, Optical methods for sensing and imaging oxygen: materials, spectroscopies and applications, *Chem. Soc. Rev.* 43, 2014, pp. 3666–3761.
- [85] B. Herman, P. Wodnicki, S. Kwon, A. Periasamy, G.W. Gordon, N. Mahajan, W. Xue Feng, Recent developments in monitoring calcium and protein interactions in cells using fluorescence lifetime microscopy, *J. Fluoresc.* 7, 1997, pp. 85–92.
- [86] K.V. Kuchibhotla, C.R. Lattarulo, B.T. Hyman, B.J. Bacskai, Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice, *Science* 323, 2009, pp. 1211–1215.
- [87] J.R. Lakowicz, H. Szmajda, K. Nowaczyk, W.J. Lederer, Fluorescence lifetime imaging of intracellular calcium in COS cells using Quin-2, *Cell Calcium* 15, 1994, pp. 7–27.
- [88] A. Miyawaki, J. Llopis, R. Helm, J.M. McCaffery, J.A. Adams, M. Ikura, R.Y. Tsien, Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin, *Nature* 388, 1997, pp. 882–887.
- [89] R. Sanders, H.C. Gerritsen, A. Draaijer, P.M. Houpt, Y.K. Levine, Fluorescence lifetime imaging of free calcium in single cells, *Bioimaging* 2, 1994, pp. 131–138.
- [90] C.D. Wilms, H. Schmidt, J. Eilers, Quantitative two-photon Ca^{2+} imaging via fluorescence lifetime analysis, *Cell Calcium* 40, 2006, pp. 73–79.
- [91] C.D. Wilms, J. Eilers, Photo-physical properties of Ca^{2+} -indicator dyes suitable for two-photon fluorescence-lifetime recordings, *J. Microsc.* 225, 2007, pp. 209–213.
- [92] K. Funk, A. Woitecki, C. Franjic-Wurtz, T. Gensch, F. Mohrlen, S. Frings, Modulation of chloride homeostasis by inflammatory mediators in dorsal root ganglion neurons, *Mol. Pain* 4, 2008, p. 32.
- [93] D. Gilbert, C. Franjic-Wurtz, K. Funk, T. Gensch, S. Frings, F. Mohrlen, Differential maturation of chloride homeostasis in primary afferent neurons of the somatosensory system, *Int. J. Dev. Neurosci.* 25, 2007, pp. 479–489.
- [94] H. Kaneko, I. Putzier, S. Frings, U.B. Kaupp, T. Gensch, Chloride accumulation in mammalian olfactory sensory neurons, *J. Neurosci.* 24, 2004, pp. 7931–7938.

- [95] M. Lahn, C. Dosche, C. Hille, Two-photon microscopy and fluorescence lifetime imaging reveal stimulus-induced intracellular Na^+ and Cl^- changes in cockroach salivary acinar cells, *Am.J. Physiol. Cell Physiol.* 300, 2011, pp. C1323–C1336.
- [96] B. Hötzer, R. Ivanov, R., Altmeier, S., Kappl, R., Jung, G., Determination of copper(II) ion concentration by lifetime measurements of green fluorescent protein, *J. Fluoresc.* 21, 2011, pp. 2143–2153.
- [97] B. Hötzer, R. Ivanov, T. Brumbarova, P. Bauer, G. Jung, Visualization of Cu^{2+} uptake and release in plant cells by fluorescence lifetime imaging microscopy, *FEBS J.* 279, 2012, pp. 410–419.
- [98] B.J. McCranor, H. Szmazinski, H.H. Zeng, A.K. Stoddard, T. Hurst C.A. Fierke, J.R. Lakowicz, R.B. Thompson, Fluorescence lifetime imaging of physiological free Cu(II) levels in live cells with a Cu(II)-selective carbonic anhydrase-based biosensor, *Metallomics* 6, 2014, pp. 1034–1042.
- [99] H. Szmazinski, J.R. Lakowicz, Sodium Green as a potential probe for intracellular sodium imaging based on fluorescence lifetime, *Anal. Biochem.* 250, 1997, pp. 131–138.
- [100] H. Szmazinski, J.R. Lakowicz, Potassium and sodium measurements at clinical concentrations using phase-modulation fluorometry, *Sens. Actuators B: Chem.* 60, 1999, pp. 8–18.
- [101] H. Szmazinski, J.R. Lakowicz, Fluorescence lifetime characterization of magnesium probes: improvement of Mg^{2+} -dynamic range and sensitivity using phase-modulation fluorometry, *J. Fluoresc.* 6, 1996, pp. 83–85.
- [102] J.M Paredes, M.D. Giron, M.J. Ruedas-Rama, A. Orte, L. Crovetto, E.M. Talavera, R. Salto, J.M. Alvarez-Pez, Real-time phosphate sensing in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM), *J. Phys. Chem. B* 117, 2013, pp. 8143–8149.
- [103] N.G. Zhegalova, G. Gonzales, M.Y. Berezin, Synthesis of nitric oxide probes with fluorescence lifetime sensitivity, *Organ. Biomol. Chem.* 11, 2013, pp. 8228–8234.
- [104] R.H. Bisby, S.W. Botchway, G.M. Greetham, J.A. Hadfield, A.T. McGown, A.W. Parker, K.M. Scherer, M. Towrie, Time-resolved nanosecond fluorescence lifetime imaging and picosecond infrared spectroscopy of combretastatin A-4 in solution and in cellular systems. *Meas. Sci. Technol.* 23, 2012.

- [105] R.H. Bisby, S.W. Botchway, J.A. Hadfield, A.T. McGown, A.W. Parker, K.M. Scherer, Fluorescence lifetime imaging of E-combretastatin uptake and distribution in live mammalian cells, *Eur. J. Cancer* 48, 2012, pp. 1896–1903.
- [106] B.M. Gadella, T.W.J. Gadella, B. Colenbrander, L.M.G. van Golde, Visualization and quantification of glycolipid polarity dynamics in the plasma membrane of the mammalian spermatozoon, *J. Cell Sci.* 107, 1994, pp. 2151–2163.
- [107] B.M. Gadella, M. Lopez-Cardozo, L.M.G. van Golde, B. Colenbrander, B., Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction. Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa, *J. Cell Sci.* 108, 1995, pp. 935–945.
- [108] R. Cubeddu, A. Pifferi, P. Taroni, A. Torricelli, G. Valentini, F. Rinaldi, E. Sorbellini, Fluorescence lifetime imaging: an application to the detection of skin tumors, *IEEE J. Select. Top. Quant. Electron.* 5, 1999, pp. 923–929.
- [109] V.V. Ghukasyan, F.J. Kao, Monitoring cellular metabolism with fluorescence lifetime of reduced nicotinamide adenine dinucleotide, *J. Phys. Chem. C* 113, 2009, pp. 11532–11540.
- [110] J. Horilova, A. Mateasika, R. Revilla-i-Domingoc, F. Raiblec, D. Chorvat Jr., A. Marcek Chorvatova, Fingerprinting of metabolic states by NAD(P)H fluorescence lifetime spectroscopy in living cells: a review, *Med. Photon.* 27, 2015, pp. 62–69.
- [111] K. König, H. Schneckenburger, R. Hibst, Time-gated *in vivo* autofluorescence imaging of dental caries, *Cell. Mol. Biol.* 45, 1999, pp. 233–239.
- [112] J.R. Lakowicz, H. Szmazinski, K. Nowaczyk, K.W. Berndt, M. Johnson, Fluorescence lifetime imaging, *Anal. Biochem.* 202, 1992, pp. 316–330.
- [113] J.R. Lakowicz, H. Szmazinski, K. Nowaczyk, M.L. Johnson, Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1992, pp. 1271–1275.
- [114] J.R. Lakowicz, H. Szmazinski, K. Nowaczyk, M.L. Johnson, Fluorescence lifetime imaging of calcium using Quin-2, *Cell Calcium* 13, 1992, pp. 131–147.
- [115] D. Schweitzer, M. Hammer, F. Schweitzer, R. Anders, T. Doebbecke, S. Schenke, E.R. Gaillard, E.R. Gaillard, *In vivo* measurement of time-resolved autofluorescence at the human fundus, *J. Biomed. Opt.* 9, 2004, pp. 1214–1222.

- [116] D. Schweitzer, S. Schenke, M. Hammer, F. Schweitzer, S. Jentsch, E. Birckner, W. Becker, A. Bergmann, Towards metabolic mapping of the human retina, *Microsc. Res. Tech.* 70, 2007, pp. 410–419.
- [117] M.C. Skala, K.M. Riching, D.K. Bird, A. Gendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K.W. Eliceiri, P.J. Keely, N. Ramanujam, *In vivo* multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia. *J. Biomed. Opt.* 12, 2007, 024014.
- [118] M.C. Skala, K.M. Riching, A. Gendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K.W. Eliceiri, J.G. White, N. Ramanujam, *In vivo* multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2007, pp. 19494–19499.
- [119] Q.R. Yu, A.A. Heikal, Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 95, 2009, pp. 46–57.
- [120] Q. Zhang, D.W. Piston, R.H. Goodman, Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science* 295, 2002, pp. 1895-1897.
- [121] T. Saxl, F. Khan, D.R. Matthews, Z.L. Zhi, O. Rolinski, S. Ameer-Beg, J. Pickup, Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging of nano-engineered glucose sensor microcapsules based on glucose/ galactose binding protein, *Biosens. Bioelectron.* 24, 2009, pp. 3229–3234.
- [122] T. Saxl, F. Khan, M. Ferla, D. Birch, J. Pickup, A fluorescence lifetime-based fibre-optic glucose sensor using glucose/ galactose binding protein, *Analyst* 136, 2011, pp. 968–972.
- [123] L. Tolosa, H. Szmajnski, G. Rao, J.R. Lakowicz, Lifetime-based sensing of glucose using energy transfer with a long lifetime donor, *Anal. Biochem.* 250, 1997, pp. 102–108.